

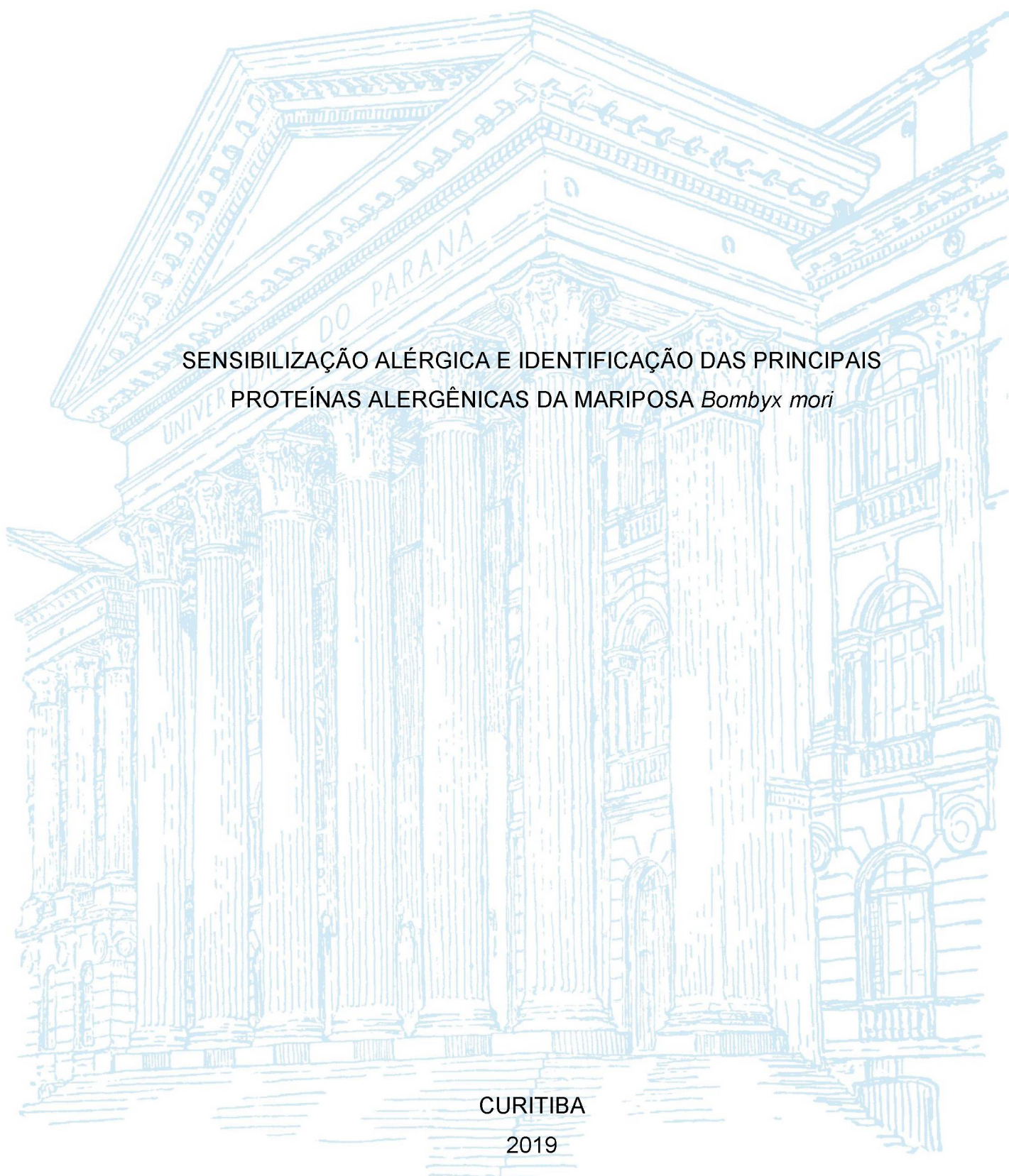
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAURA MARIA LACERDA ARAUJO

SENSIBILIZAÇÃO ALÉRGICA E IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS
PROTEÍNAS ALERGÊNICAS DA MARIPOSA *Bombyx mori*

CURITIBA

2019



LAURA MARIA LACERDA ARAUJO

SENSIBILIZAÇÃO ALÉRGICA E IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS
PROTEÍNAS ALERGÊNICAS DA MARIPOSA *Bombyx mori*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração: Alergia e Imunologia Pediátrica.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho
Coorientador: Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin

CURITIBA
2019

Araujo, Laura Maria Lacerda
Identificação das principais proteínas alergênicas das asas da mariposa
Bombyx mori [recurso eletrônico] / Laura Maria Lacerda Araujo – Curitiba, 2019.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do
Adolescente. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientador: Professor Dr. Nelson Augusto Rosário Filho
Coorientador: Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin

1. *Bombyx*. 2. Alérgenos. 3. Asma. 4. Rinite alérgica. I. Rosário Filho, Nelson
Augusto. II. Zanchin, Nilson Ivo Tonin. III. Universidade Federal do Paraná.
IV. Título.

CDD 616.97



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

*Programa de Pós-Graduação Mestrado e Doutorado
em Saúde da Criança e do Adolescente*



Termo de Aprovação

Os Membros da Banca Examinadora designada pelo colegiado do **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO - MESTRADO E DOUTORADO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**, do Setor de Ciências Saúde da Universidade Federal do Paraná, foram convocados para realizar arguição a Doutoranda,

Laura Maria Lacerda Araújo

em relação a sua Dissertação de Mestrado intitulada:

**“SENSIBILIZAÇÃO ALÉRGICA E IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS
PROTEÍNAS ALERGÊNICAS DA MARIPOSA *Bombyx mori*”**


Realizado a avaliação do trabalho são de parecer favorável à ***Aprovação*** da acadêmica

Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente,

Área de Concentração: ***Alergia, Imunologia e Pneumologia Pediátrica***,

Área Específica: ***Medicina***.

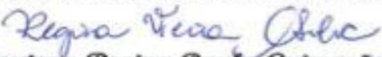
Curitiba, 31 de janeiro de 2018


Professor Doutor Nelson Augusto Rosário Filho
Professor Titular do Departamento de Pediatria da Universidade Federal do Paraná-UFPR
Presidente da Banca Examinadora e Orientador do Trabalho.


Professor Doutor Renato Mitsunori Nishihara
Titular da Disciplina de Imunologia e Microbiologia Médica Universidade Positivo e Faculdade Evangélica do Paraná; Primeiro Examinador.


Professora Doutora Débora Carla Chong e Silva
Professora Adjunta da Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUC-PR; Segunda Examinadora.


Professor Doutor Herberto José Chong Neto
Professor Associado do Departamento de Pediatria da Universidade Federal do Paraná-UFPR; Terceiro Examinador.


Professora Doutora Regina Paula Guimarães Vieira Cavalcante da Silva
Professora Associada do Departamento de Pediatria da Universidade Federal do Paraná-UFPR.
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação - Mestrado e Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente da UFPR.

Dedico esta tese à minha família, particularmente meu marido Guilherme, e meus amigos sempre presentes, sem os quais não teria dado mais este importante passo para minha jornada acadêmica e conquista pessoal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço com carinho muito especial ao meu colega, amigo e grande incentivador Claudemir de Souza por toda a dedicação e empenho para ajudar a concretizar esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho, orientador deste estudo, pelo presente da ideia inicial desta pesquisa e pelo constante incentivo.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo por três anos para realização deste doutorado.

Ao programa de pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente por acreditar no potencial do trabalho.

Ao ICC por abrir as portas e fomentar material e pessoal que tornaram este estudo possível, em especial ao meu co-orientador Nilson Zanchin e aos colegas Priscila Tonon e Ueriton Dias de Oliveira.

RESUMO

Introdução: a mariposa do bicho-da-seda é uma fonte significativa de aeroalérgenos. Foi demonstrada alta prevalência de sensibilização a extrato de *Bombyx mori* em grupo de indivíduos com doenças alérgicas respiratórias, sendo o segundo em frequência de positividade após os ácaros da poeira. Seus alérgenos inalantes podem desencadear sintomas de asma e rinite alérgica em sujeitos predispostos, após exposição domiciliar ou ocupacional. Não há estudos sobre alérgenos desta espécie de mariposa envolvidos em reações alérgicas respiratórias. O objetivo deste estudo foi determinar as principais proteínas alergênicas das asas da mariposa *Bombyx mori* responsáveis pela sensibilização alérgica de indivíduos diagnosticados com rinite alérgica e/ou asma. **Método:** foi realizado um estudo experimental em que foram incluídos 36 participantes, submetidos a teste cutâneo alérgico com extrato preparado a partir das asas da mariposa *Bombyx mori* e seis outros aeroalérgenos padronizados, além de coleta de sangue venoso. Divididos em três grupos: o grupo 1 formado por indivíduos cujo teste cutâneo alérgico foi positivo para extrato de mariposa (n=21), grupo 2 consistiu de sujeitos cujo teste alérgico foi positivo para ácaro da poeira (n=8) e grupo 3 composto por não alérgicos e cujo teste cutâneo foi negativo para todos os alérgenos testados, como controles negativos (n=7). A partir dos respectivos soros, foi feito *Western blot* com extrato de asas de mariposa utilizando anticorpos anti-IgE. Foi desenvolvida técnica de cromatografia por imunoafinidade para purificar as proteínas a partir do extrato bruto de *Bombyx mori*, que também foi analisado por *Immunoblot*, usando *pool* de soros dos participantes dos grupos 1 e 3. **Resultados:** entre os 21 participantes do grupo 1, dezenove reagiram ao extrato de *Bombyx mori* por *Western blot*. Todos reagiram à banda de 80 kDa, cinco outras bandas (66, 50, 45, 37 e 30 kDa) foram identificadas em mais de 50% dos indivíduos testados, consideradas proteínas *major*. Dos 8 participantes do grupo 2, sete mostraram reatividade ao extrato de mariposa por *Western blot*. Estes mesmos reagiram à banda de 66 kDa e duas outras (50 e 40 kDa) foram identificadas em mais de 50% dos sujeitos testados. Amostras de soro dos indivíduos saudáveis não reagiram ao extrato de *Bombyx mori*. SDS-PAGE a partir de cromatografia por imunoafinidade identificou as bandas 150, 120, 100, 80, 66, 50, 45, 37, 30, 25, 17 kDa. Todas presentes no extrato bruto dos indivíduos positivos para mariposa por *immunoblot*. Baseado em bancos de dados de pesquisa sobre as massas moleculares já descritas para *Bombyx mori*, foi possível identificar 5 das 6 proteínas principais reagentes nos imunoensaios. A proteína de 80 kDa foi visualizada em todos os participantes reagentes do grupo 1 e em nenhum dos pacientes do grupo 2, sendo um potencial alérgeno específico da asa da mariposa. **Conclusão:** este foi o primeiro estudo a destacar as principais proteínas alergênicas da mariposa *Bombyx mori* em indivíduos diagnosticados com doenças alérgicas respiratórias a partir de extrato preparado com as asas desta espécie de inseto.

Palavras-chave: *Bombyx*, alérgenos, asma, rinite alérgica

ABSTRACT

Background: silkworm moth is a significant source of aeroallergens. High prevalence of sensitization to *Bombyx mori* extract was demonstrated in a group of individuals with allergic respiratory diseases, being the second in frequency of positivity, after house dust mites. Its inhalant allergens might trigger symptoms of asthma and allergic rhinitis in predisposed subjects, after home or occupational exposure. There are no studies on these moth species allergens involved in allergic respiratory reactions. The aim of this study was to determine the major allergenic proteins of *Bombyx mori* moth's wings responsible for allergic sensitization of individuals diagnosed with allergic rhinitis and/or asthma. Method: an experimental study was performed in which 36 participants were included, all submitted to skin prick test with *Bombyx mori*'s wings and other six aeroallergens standardized extracts, as well as blood samples collection. They were divided into three groups: group 1 consisted of 21 blood samples collection from skin prick test positive to *Bombyx mori* extract allergic participants (group 1), eight samples from mite skin prick test positive extract allergic subjects (group 2) and 7 samples from negative non allergic controls (group 3). From respective sera, Western blot was performed with moth's wings extract using anti-IgE antibodies. Immunoaffinity chromatography was developed in order to purify the proteins from *Bombyx mori* crude extract, which were also analysed by Immunoblot, using groups 1 and 3 participants pooled sera. Results: among the 21 participants from group 1, nineteen reacted to moth extract by *Western blot*. All reacted to a protein at 80 kDa, five other bands (66, 50, 45, 37 e 30 kDa) were identified in more than 50% of individuals tested, considered major proteins. From 8 participants of group 2, seven showed reactivity to moth extract by Western blot. Those same reacted to a protein at 66 kDa and other two (50 e 40 kDa) were identified in more than 50% of the subjects tested. Sera samples from healthy individuals did not react to *Bombyx mori* extract. SDS-PAGE from immunoaffinity chromatography identified bands at 150, 120, 100, 80, 66, 50, 45, 37, 30, 25, 17 kDa. All present in Immunoblot from moth extract positive individuals. Based on research databank on molecular mass already described to *Bombyx mori*, it was possible to identify 5 from 6 major proteins reactive on immunoassays. The 80 kDa protein was seen in all reactive participants from group 1 and in none of the patients from group 2, being a potential specific allergen from moth's wings. Conclusion: this was the first study to highlight the major allergenic proteins of *Bombyx mori* moth in individuals diagnosed with allergic respiratory diseases from extract prepared from this insect species wings.

Key words: *Bombyx*, allergens, asthma, rhinitis, allergic

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 - CICLO REPRODUTIVO DAS MARIPOSAS.....	19
FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DE SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES DA AMOSTRA	25
FIGURA 3 - MOLÉCULAS DO COMPLEXO PARA DETECÇÃO E CAPTURA DOS ALÉRGENOS A PARTIR DO EXTRATO DE <i>BOMBYX MORI</i>	32
FIGURA 4 - SDS-PAGE DA CROMATOGRÁFIA POR IMUNOAFINIDADE COM PROTEÍNA A RECOMBINANTE ACOPLADA EM RESINA DE NÍQUEL.....	38
FIGURA 5 - PADRONIZAÇÃO DE <i>WESTERN BLOT</i> PARA IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS ALERGÊNICAS DE <i>BOMBYX MORI</i>	39
FIGURA 6 - COMPARAÇÃO NA DETECÇÃO DE IgES E IgGS ENTRE <i>POOL</i> DE SOROS DO GRUPO 1 E 3 POR MEIO DE <i>WESTERN BLOT</i>	40
FIGURA 7 - <i>WESTERN BLOT</i> COM SOROS DO GRUPO 1 (1-7).....	41
FIGURA 8 - <i>WESTERN BLOT</i> COM SOROS DO GRUPO 1 (8-14).....	41
FIGURA 9 - <i>WESTERN BLOT</i> COM SOROS DO GRUPO 1 (15-21)	42
FIGURA 10 - <i>WESTERN BLOT</i> CONTROLE COM SOROS DO GRUPO 2	42
FIGURA 11 - GRÁFICO SOBRE A PORCENTAGEM DE POSITIVIDADE DAS POSSÍVEIS PROTEÍNAS POR <i>WESTERN BLOT</i> NOS PARTICIPANTES DOS GRUPOS 1 E 2	43
FIGURA 12 - <i>WESTERN BLOT</i> CONTROLE COM SOROS DO GRUPO 3	44
FIGURA 13 - SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA VITELOGENINA	45
FIGURA 14 - SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA ACTINA	45
TABELA 1 – DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES	34
TABELA 2 – FREQUÊNCIA DE POSITIVIDADE AO TCA COM DIFERENTES ALÉRGENOS NOS GRUPOS 1 (n 21) E 2 (n 8)	35
TABELA 3 – FREQUÊNCIA DE POSITIVIDADE AOS COMPONENTES ALERGÊNICOS INALANTES POR IMMUNOCAP ISAC NOS NOS GRUPOS 1 E 2	36
TABELA 4 – PRINCIPAIS PROTEÍNAS SELECIONADAS JÁ DESCRITAS COMO ALÉRGENOS.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARIA - *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*

Bm - *Bombyx mori*

BSA - Bovine Serum Albumine

BCIP - *Bromo-Chloro-Indolyl Phosphate*

CHC-UFPR – Complexo do Hospital de Clínicas-Universidade Federal do Paraná

EDTA - *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

EUA - Estados Unidos da América

GINA - *Global Initiative for Asthma*

ICC – Instituto Carlos Chagas

IgE - Imunoglobulina E

IPTG - *Isopropyl-D-thiogalactopyranoside*

LB - *Luria Bertani broth*

MM - massa molecular

NBT - *Nitro Blue Tetrazolium*

NCBI - National Center for Biotechnology Information

PDB - Protein Data Bank

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PMSF - *Phenyl-Methyl-Sulfonyl Fluoride*

SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

RAST - *radioallergosorbent test*

TCA - Testes Cutâneos Alérgicos

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

xg - unidade de medida de força relativa da centrifugação

Wb – *Western blot*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVO GERAL	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 DOENÇAS ALÉRGICAS RESPIRATÓRIAS	15
2.1.1 Sensibilização alérgica	15
2.1.2 Diagnóstico de rinite alérgica e asma	16
2.2 ALERGIA RESPIRATÓRIA POR ANTÍGENOS DE INSETOS	17
2.2.1 O papel da mariposa do bicho-da-seda	19
2.2.2 Mariposa como alérgeno no ambiente ocupacional	20
2.2.3 Mariposa como alérgeno no ambiente doméstico	21
2.3 CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS ALÉRGENOS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 TIPO DO ESTUDO	25
3.2 CASUÍSTICA	25
3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	25
3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	26
3.5 POPULAÇÃO DO ESTUDO	26
3.6 AMOSTRA E TÉCNICA DE AMOSTRAGEM	26
3.7 PROCEDIMENTOS DA PESQUISA	26
3.7.1 Dados clínicos e epidemiológicos	27
3.7.2 Preparo do extrato alérgico de mariposa	27
3.7.3 Obtenção do alérgeno arginina-quinase recombinante	28
3.7.4 TCA por punção	29
3.7.5 Coleta de sangue venoso	29
3.7.6 Detecção de componentes alérgicos por ImmunoCAP ISAC	30
3.7.7 Imunodetecção	30
3.7.8 Espectrometria de massas	31
3.7.9 Cromatografia de imunoafinidade	32
3.7.10 Identificação das proteínas alérgicas	32
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
3.9 ÉTICA EM PESQUISA	33

3.10 FOMENTO PARA PESQUISA	33
4 RESULTADOS	34
4.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA DE ESTUDO	34
4.2 IMMUNOCAP ISAC	35
4.3 CROMATOGRAFIA POR IMUNOAFINIDADE	37
4.4 IMUNOENSAIOS	38
4.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS	44
4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS POTENCIAIS ALÉRGENOS	45
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
APÊNDICES	59
ANEXOS	66

1 INTRODUÇÃO

As doenças alérgicas respiratórias, que incluem rinite e asma, vem apresentando aumento expressivo na incidência ao longo das últimas décadas. O impacto clínico em termos de saúde pública é considerável e demanda o desenvolvimento de planos de ação e políticas públicas para o seu controle (HOFFMAN *et al.*, 2017).

São doenças inflamatórias da mucosa respiratória, cujos sintomas são desencadeados, entre outros fatores, por exposição a aeroalérgenos. Os principais descritos são os ácaros da poeira doméstica, polens, epitélios animais, mofos e baratas (SAKANO *et al.*, 2017).

Há anos tem-se estudado o envolvimento de alérgenos de insetos como desencadeantes de sintomas alérgicos respiratórios (OKUDA *et al.*, 2002). Demonstrou-se a importância da mariposa como o segundo aeroalérgeno em frequência de positividade verificada por meio de testes cutâneos alérgicos (TCA) e Imunoglobulina E (IgE) específica sérica em grupo de pacientes com asma e rinite alérgica, após os ácaros da poeira. Neste estudo realizado na cidade de Curitiba, testes cutâneos com extrato confeccionado a partir das asas da mariposa do bicho-da-seda espécie *Bombyx mori* (Bm) realizados em 99 participantes mostraram 52,5% de reatividade e IgE específica sérica pelo método ImmunoCAP de 60% (ARAUJO; ROSÁRIO; RIEDI, 2014).

As mariposas têm sido crescentemente apontadas como fontes significativas de alérgenos inalantes, tanto em ambientes externos quanto intradomiciliares. Suas asas são cobertas de escamas, as quais se desprendem, permanecendo em suspensão no ar e podem desta forma sensibilizar e posteriormente provocar sintomas de alergia respiratória em indivíduos predispostos (LIERL, 1994).

A mariposa do bicho-da-seda é usada como modelo para estudos pelo fato de ser domesticada e facilmente criada em ambiente laboratorial controlado, além de já ter seu genoma sequenciado (MITA., *et al.*, 2004). Tem reatividade cruzada com outras espécies de mariposas e borboletas e foi comprovado que pacientes com doenças alérgicas respiratórias podem desenvolver sintomas a partir da exposição ambiental aos seus alérgenos, encontrados principalmente nas suas asas (KINO; OSHIMA, 1978; KINO; OSHIMA, 1979). Concentrações de antígenos de mariposa verificadas por radioimunoensaio em amostras de poeira em ambiente externo (não

domiciliar) durante um período de 3 anos foram elevadas e em níveis comparáveis aos de polens (WYNN *et al.*, 1988).

Até o momento, poucos alérgenos relacionados à alergia respiratória por Bm foram identificados, nenhum deles a partir da sua forma adulta, a mariposa. A maioria dos alérgenos descritos foi relacionada à alergia alimentar por meio da ingestão da pupa de Bm, principalmente em países asiáticos, onde é um alimento tradicional (ZHAO *et al.*, 2015; JEONG *et al.*, 2016) ou após contato na pele e/ou mucosa respiratória em trabalhadores da indústria da seda (ZUO *et al.*, 2015).

Para melhor compreensão das doenças alérgicas respiratórias relacionadas à sensibilização pela mariposa Bm, são necessários estudos que incluam a caracterização e identificação de novos alérgenos envolvidos neste processo.

1.1 OBJETIVO GERAL

Identificar potenciais proteínas alergênicas presentes no extrato de asas da mariposa do bicho-da-seda Bm.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar extrato alergênico a partir das asas da mariposa Bm;
- Purificar o extrato da mariposa por meio de cromatografia por imunoafinidade;
- Determinar a massa molecular das principais proteínas alergênicas da mariposa Bm por meio de *Western blot* (Wb) com extrato bruto e purificado;
- Comparar os resultados encontrados entre os participantes dos três grupos (sensíveis à Bm, sensíveis ao ácaro da poeira e controles negativos).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇAS ALÉRGICAS RESPIRATÓRIAS

2.1.1 Sensibilização alérgica

Sensibilização a determinado alérgeno pode ser determinada a partir da detecção de anticorpos específicos contra o mesmo. A presença de IgE específica no soro ou positividade a TCA de leitura imediata são as principais maneiras de se avaliar o estado atópico de um indivíduo (JOHANSSON *et al.*, 2004).

Sensibilização a alérgenos inalantes é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas respiratórias como asma e rinite, embora a extensão deste efeito seja amplamente discutida (ARSHAD *et al.*, 2001; CUSTOVIC; SIMPSON, 2004). Exposição precoce na infância a epitélios de animais, principalmente gato, polens e fungos pode estar associada à atopia na adolescência ou idade adulta (DELA BIANCA; WANDALSEN; SOLÉ, 2010). Índices preditivos validados para o desenvolvimento de asma utilizam a sensibilização a pelo menos um aeroalérgeno como critério maior e a pelo menos um alérgeno alimentar (leite de vaca, ovo e amendoim) como critério menor em ensaios clínicos robustos provenientes de coortes de nascimento (RODRIGUEZ-MARTÍNEZ; SOSSA-BRICEÑO; CASTRO-RODRIGUEZ, 2017).

Com o objetivo de verificar a relevância clínica da sensibilização a alérgenos inalantes na Europa, foram avaliados 3034 indivíduos referidos a um de 17 centros de alergia em 14 países diferentes. Foram realizados TCA para os 18 alérgenos locais mais frequentes e avaliação clínica. Em todos os países foi descrita taxa de sensibilização maior ou igual a 60% nos pacientes avaliados, embora tenha havido diferenças na distribuição das sensibilizações alérgicas dependendo do país. Os autores concluíram que houve correlação significativa entre a presença de doença alérgica (asma, rinite alérgica, dermatite atópica e alergia alimentar) e o número de sensibilizações (BURBACH *et al.*, 2009).

Em Curitiba, foi testada a frequência de sensibilidade cutânea a alérgenos de ácaro da poeira e pólen de gramínea em 3271 escolares. Encontrou-se TCA positivo para *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Lolium multiflorum* em 31,3% e 4,7% respectivamente. A alta frequência de sensibilização aos ácaros domésticos deve

servir de alerta para a valorização de uma reação cutânea positiva em indivíduos com sintomas respiratórios, entretanto nem sempre signifique que estes alérgenos tenham relação causal com a doença respiratória (ESTEVES *et al.*, 1999).

Na mesma cidade, avaliou-se a frequência de positividade por TCA a 7 alérgenos inalantes em crianças e adolescentes acompanhados em ambulatório especializado de alergia pediátrica. Os 742 pacientes tinham diagnóstico prévio de asma e ou rinite alérgica. Destes, 61,8% eram sensibilizados ao *Dermatophagoides pteronyssinus*, 42,6% à *Blomia tropicalis* e, após os ácaros da poeira, 16,8% foram positivos para a espécie de mariposa Bm. Sugere-se que o último é prevalente e deve ser melhor avaliado como alérgeno inalante em casos de doenças alérgicas respiratórias (dados não publicados da pesquisadora).

O conhecimento sobre os aeroalérgenos sensibilizantes e o grau de exposição a eles nos diferentes ambientes é importante não somente para o diagnóstico das doenças alérgicas, mas também como plano terapêutico, tendo em vista a possibilidade de imunoterapia específica (DUTRA; ROSÁRIO; ZAVADNIAK, 2001).

2.1.2 Diagnóstico de rinite alérgica e asma

Rinite alérgica é uma das doenças mais comuns em todo o mundo. Tem prevalência estimada de 25% em crianças e até 40% em adultos. Considerada resultado de alergia IgE mediada associada à inflamação nasal de variável intensidade.

O diagnóstico de rinite alérgica é baseado na concordância entre uma história típica de sintomas como rinorreia, espirros, obstrução nasal e prurido associada a testes baseados na demonstração de IgE alérgeno-específica na pele (TCA por punção) ou sangue (IgEs específicas mensuradas por imunoensaios) (BOUSQUET *et al.*, 2008). A presença de sintomas oculares é frequente, o que configura rinoconjuntivite alérgica; além de prurido em palato, gotejamento pós-nasal e tosse.

O impacto e os custos relacionados à rinite são substanciais. Principalmente quando classificada como persistente e moderada a grave, pode levar à queda na qualidade de vida, com prejuízo às atividades laborais e escolares. Além de estar associada à asma em até 38% dos casos. É considerada como fator de risco para asma e, se não controlada, pode afetar o controle da mesma (BROZEK *et al.*, 2016).

A asma, da mesma maneira, é uma doença inflamatória das vias aéreas, mas com maior potencial de gravidade. Em crianças, é a doença crônica mais frequente, tendo impacto no dia-a-dia dos pacientes e suas famílias (DUCHARM; TSE; CHAUHAN, 2014).

Asma provoca sintomas respiratórios como sibilância, dispneia, opressão torácica e tosse; que podem variar ao longo do tempo em termos de ocorrência, frequência e intensidade. Estes sintomas geram limitação das atividades e crises que algumas vezes requerem atendimento de emergência e, em alguns casos podem ser fatais. Fatores como infecções respiratórias, exposição doméstica ou ocupacional a alérgenos (ácaros da poeira, polens, baratas), fumaça de cigarro, exercício físico e estresse são possíveis gatilhos para crises ou piora dos sintomas de asma.

O diagnóstico é baseado na clínica característica de sintomas respiratórios associada à limitação ao fluxo aéreo variável, que pode ser avaliada por meio de testes de função pulmonar (GINA, 2018).

A avaliação sobre o perfil de sensibilidade alérgica nos pacientes com asma e rinite determinada por meio da positividade aos testes cutâneos ou detecção de IgE específica sérica é de fundamental importância para o seu diagnóstico, pois é capaz de definir padrões locais e individuais dependendo do ambiente e população. Técnicas mais recentes de análise molecular dos alérgenos foram capazes de refinar esse diagnóstico, identificando-os de maneira mais precisa. Embora a interpretação se torne mais complexa, pois deve-se levar em consideração a correlação com sintomas clínicos e a possibilidade de reação cruzada entre diferentes fontes alergênicas.

O conhecimento sobre a exposição local aos alérgenos mais prevalentes deve ser incentivado, pois varia de acordo com a população estudada. E terá impacto futuro na prevenção e tratamento das doenças alérgicas (ARAUJO; ROSÁRIO; MARI, 2015).

2.2 ALERGIA RESPIRATÓRIA POR ANTÍGENOS DE INSETOS

O papel dos insetos na produção de alérgenos inalantes e desencadeamento de sintomas respiratórios vem sendo discutido há décadas (POMÈS, 2008). Mariposas, borboletas, mosquitos e baratas já foram descritos como sensibilizantes em ambientes externos, mas principalmente intradomiciliares (KHURANA, BRIDGEWATER, RABIN, 2017).

A quantidade e a variedade de espécies pode ter distribuição sazonal de acordo com o clima ou ciclo reprodutivo de cada inseto (ARAUJO, ROSÁRIO-FILHO, 2018). A importância das diferentes espécies de insetos como fontes alergênicas conforme a localização geográfica ainda não está bem definida, mas estima-se que haja entre 5 e 10 milhões de espécies de insetos, embora somente cerca de 750000 tenham sido identificadas e catalogadas por entomologistas.

Resíduos que emanam destes insetos como escamas, pelos, secreções e partes desintegradas do corpo podem estar contidos na poeira doméstica, desencadeando sintomas de asma e rinoconjuntivite alérgica em indivíduos sensibilizados (POMÈS, 2008). Até o momento há pouca informação sobre incidência, natureza, reatividade clínica e cruzada entre alérgenos de insetos.

Diversos componentes do corpo dos insetos podem ser alergênicos. Para que se tornem alérgenos inalantes, suas proteínas devem estar em suspensão no ar e há três maneiras deste processo ocorrer. A primeira é por meio do corpo do inseto morto, que pelo fato de ser seco e leve, torna-se parte da poeira doméstica. A segunda, por destaque de pelos, escamas e exoesqueleto deixado por alguns insetos durante sua metamorfose. Por fim, produtos de secreção metabólica como as fezes podem se tornar potenciais alérgenos (ARAUJO, ROSÁRIO-FILHO, 2018). A dispersão destas partículas ocorre de forma ativa pela migração dos insetos para diversos ambientes e de forma passiva pelo ar. Estudos utilizando diversos métodos de coleta em ambientes externos e domésticos encontraram altos níveis de alérgenos de baratas, moscas, borboletas e mariposas em amostras de poeira (ARIANO; PANZANI, 2001).

Com relação à alergia inalatória a insetos, o mais estudado tem sido a barata, cuja infestação doméstica é causa de asma e considerada questão de saúde pública nos Estados Unidos da América (EUA) (ARRUDA *et al.*, 2000). Há poucas e antigas descrições sobre asma e rinite desencadeadas por espécies de moscas e mosquitos como *may fly* e *caddis fly* (FEINBERG; FEINBERG; BENAÏM-PINTO, 1956; KINO *et al.*, 1987). Estudo realizado na cidade de São Paulo com 40 pacientes asmáticos apresentou positividade ao TCA com extrato de mosquitos em 32,5% e mariposas em 65% dos casos. Foi o primeiro a documentar o papel da mariposa como alérgeno desencadeante de sintomas respiratórios no Brasil (MENDES; LACAZ, 1965).

2.2.1 O papel da mariposa do bicho-da-seda

A espécie *Bombyx mori*, pertencente ao gênero *Bombyx*, família *Bombycidae*, ordem *Lepidoptera*, classe dos Insetos, filo *Artrópode*, reino *Animal* (FONSECA; FONSECA, 1988), é responsável pela produção de mais de 95% da seda mundial. Faz parte de uma atividade agroindustrial muito antiga chamada sericicultura, que iniciou na China há cerca de 5000 anos. Compreende a cultura da amoreira, a criação do bicho-da-seda e a produção dos fios de seda que são fornecidos para a indústria têxtil (CORRADELO, 1987).

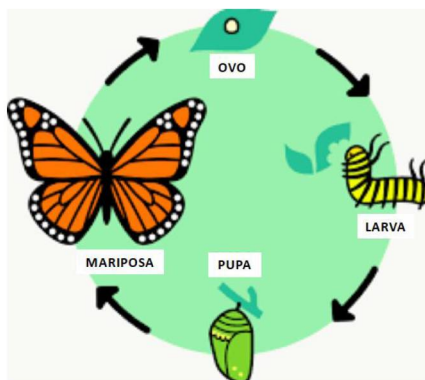


FIGURA 1 – CICLO REPRODUTIVO DAS MARIPOSAS
FONTE: Adaptado de <https://mariposas.net/ciclo-vida> (2018)

A *Bombyx mori* produz um filamento de proteína produzido a partir de suas glândulas sericígenas que constitui a seda. Alimenta-se exclusivamente de folhas de amoreira durante sua fase larvar. Ao final de 28 dias, a lagarta produz o casulo, dentro do qual se dá a metamorfose da pupa ou crisálida para o estágio adulto, a mariposa (OKINO, 1982).

Os sericulturistas adquirem os ovos do bicho-da-seda, de onde a larva eclode e inicia seus estágios de maturação (FIGURA 1). A larva madura produz os casulos, que são selecionados manualmente e enviados para as fábricas de fiação de seda (YOSHIDA, 1994).

Durante o processo de criação do bicho-da-seda, os trabalhadores estão expostos diretamente a antígenos inaláveis, especialmente durante a seleção de casulos (KOBAYASHI, 1970). No entanto, já foram detectados alérgenos nos produtos excretados do bicho-da-seda, na hemolinfa das crisálidas e na poeira das asas das

mariposas (KOBAYASHI; NAKASAWA; YOSHIDA, 1972). Portanto, os sericicultores podem se sensibilizar em qualquer estágio da produção de seda.

2.2.2 Mariposa como alérgeno no ambiente ocupacional

Há diversos relatos de indivíduos que, durante a atividade de sericicultura, desenvolveram doenças alérgicas respiratórias. Os alérgenos produzidos durante a manufatura da seda podem desencadear sintomas de asma, rinite e conjuntivite alérgicas (KINO; OSHIMA, 1978; KINO; OSHIMA, 1979).

Na Índia, operários de fábricas de fiação de seda foram submetidos à avaliação clínica, TCA e dosagem de IgE específica no soro a partir de antígenos de casulos e pupas do bicho-da-seda. De um total de 243 indivíduos, 36% obtiveram diagnóstico de asma e destes, 16,9% deixavam de apresentar sintomas quando afastados do trabalho por um período prolongado, diagnosticados com asma ocupacional. Estes apresentaram positividade aos extratos alergênicos testados em 70% dos casos (HARINDRANATH; PRAKASH; SUBBA RAO, 1985).

Médicos do trabalho no Sri Lanka revelaram que, de 53 trabalhadoras com média de trabalho de 5,8 anos na indústria da seda, dezoito (34%) tinham asma ocupacional. Os sintomas respiratórios ocorriam dentro de 30 min a 6 h após o início do trabalho e melhoravam dentro de 1 a 8 h após deixarem a fábrica (URAGODA; WIJEKOON, 1991).

Em estudo chinês, verificou-se que 68 de 90 sericicultores apresentavam sintomas de alergia respiratória e 14 tinham diagnóstico de asma ocupacional. Os alérgenos relacionados foram provenientes de casulos, excreções e urina do bicho-da-seda, e escamas das asas das mariposas (WANG; ZHENG; ZHANG, 1994).

Recentemente, foi realizado na Índia estudo comparativo pelo período de um ano entre três grupos, o primeiro composto por sericicultores e dois controles contendo respectivamente moradores de áreas próximas à indústria de fiação de seda e moradores de áreas mais afastadas. Foram realizados TCA com extratos confeccionados a partir da pupa, casulo e sericina, proteína alergênica da mariposa do bicho-da-seda. A sensibilidade foi maior nos trabalhadores (35,8%). Ao comparar os outros dois grupos, foi encontrado mais que o dobro de positividade nos moradores próximos às indústrias. Isso mostra que os alérgenos liberados no processo de confecção de seda podem ser levados pelo ar, espalhando-se pelo ambiente e

provocando sensibilização na população que vive no seu entorno (GOWDA *et al.*, 2016).

Na China, os resíduos da indústria da seda, descartados para utilização em preenchimento de colchões, foram apontados como antígenos. Responsáveis por conter diversos alérgenos (variando entre 14 e 70 kDa) e assim provocar reações alérgicas IgE mediadas respiratórias e cutâneas em indivíduos previamente sensibilizados (SUN *et al.*, 2014).

2.2.3 Mariposa como alérgeno no ambiente doméstico

Estudo realizado em casas de uma província japonesa encontrou por meio de imunoensaio realizado a partir da poeira doméstica, aeroalérgenos de três espécies de insetos (incluindo a mariposa) em suspensão no ar, cujas concentrações variaram ao longo de um ano. Conclui-se, que os insetos são alérgenos inalantes comuns e podem ter variação sazonal (KINO *et al.*, 1987).

Concentrações de antígenos de mariposa verificadas por radioimunoensaio em amostras de poeira em ambiente externo (não domiciliar) durante um período de 3 anos foram elevadas e em níveis comparáveis aos de polens. Testes cutâneos com extratos de mariposa em pacientes alérgicos mostraram 45% de reatividade nesta população (WYNN *et al.*, 1988).

Cinquenta asmáticos sem história de exposição ocupacional foram submetidos a testes cutâneos e dosagem de IgE específica sérica com extratos provenientes das asas e do corpo da mariposa do bicho-da-seda Bm. Houve reatividade cutânea em 68% e 56% dos pacientes respectivamente e positividade ao RAST (*radioallergosorbent test*), em 44% e 22% dos casos respectivamente. Sugerindo que os componentes das asas da mariposa do bicho-da-seda são os sensibilizantes principais. Demonstrou-se ainda por meio de testes de inibição que há reação cruzada entre alérgenos de borboletas e mariposas (KINO; OSHIMA, 1979).

Alta taxa de sensibilidade à mariposa foi detectada por Kino e Oshima (1978) durante avaliação de 66 pacientes asmáticos selecionados aleatoriamente. Destes, 37 (56%) apresentaram TCA intradérmico positivo ao extrato de mariposa e 20 (30,3%) obtiveram positividade à IgE específica no soro para mariposa. Os autores comentam que são insetos prontamente atraídos por luzes artificiais e frequentemente

voam para o interior das residências, portanto podem ser fatores causais importantes de asma.

Foram mensuradas IgEs específicas para mariposa, mosquito e barata no soro de 560 indivíduos com diagnóstico de rinite alérgica e obtiveram-se as seguintes frequências de positividade respectivamente: 32,5%, 16,1% e 13,4%. Nos sujeitos em que os valores foram mais elevados, a provocação nasal com antígenos de mariposa foi positiva em 61,5%. Demonstrando que as mariposas são alérgenos inaláveis que provocam rinite alérgica (OKUDA *et al.*, 2002).

Com o objetivo de avaliar a cosensibilização entre Bm e 9 alérgenos inaláveis comuns em uma região ao Sul da China, foram selecionados 175 participantes diagnosticados com alguma doença alérgica respiratória que acompanhavam em ambulatório especializado. Praticamente metade da amostra apresentou positividade à mariposa por meio de IgE específica sérica. Além disso, houve concomitância com outros 5 alérgenos comuns, incluindo ácaros da poeira e baratas. Os autores concluem que houve alta prevalência de sensibilização a essa espécie de mariposa e cogita-se que haja reatividade cruzada com estes outros alérgenos testados, mas sugerem que outros estudos de inibição sérica devem ser feitos para confirmar a presença de reatividade cruzada (SUN *et al.*, 2014).

Estudos realizados com intervalo de 17 anos na cidade de Curitiba a respeito da sensibilização atópica em crianças e adolescentes com diagnóstico de asma e/ou rinite alérgica detectaram positividade a extrato de mariposa (1:20 peso/volume) em 38,4% e 52,5% dos casos respectivamente. Sendo que no primeiro estudo foi testada mariposa do gênero *Heterocera* no segundo estudo, mais recente, a espécie de mariposa *Bombyx mori*. Em ambos, foi o segundo alérgeno em frequência de sensibilidade após o ácaro da poeira. Sugeriu-se como conclusão dos dois estudos, que o alto índice de sensibilização à mariposa requeria uma melhor avaliação sobre sua relevância clínica (ROSÁRIO; VILELA, 1997; ARAUJO; ROSARIO FILHO; RIEDI, 2014).

Nos últimos anos, foram introduzidos novos métodos bioquímicos de identificação de moléculas alergênicas, que permitiram melhor caracterização destes alérgenos. Auxiliando a diferenciação entre sensibilizantes primários e antígenos de reação cruzada. A determinação de IgE específica pelo sistema *microarray* utiliza moléculas purificadas obtidas por técnicas de DNA recombinante ou a partir de fontes naturais das mais variadas origens (ARAUJO; ROSARIO; MARI, 2016).

Os novos alérgenos que vão sendo identificados, são nomeados da seguinte maneira: utilizam-se as primeiras letras do gênero, a primeira da espécie e são numerados conforme a ordem de descoberta e caracterização. Até o presente momento, já foram identificados 3 componentes alergênicos a partir da mariposa Bm: Bomb m 1, Bomb m 7 e Bom m 9 (LIU et al., 2009; ZHONG, 2001; ZUO., *et al*, 2015), derivados respectivamente das proteínas arginina-quinase, tropomiosina e a última lipoproteína da hemolinfa. Foram descritos como desencadeantes de reações alérgicas alimentares após o consumo da pupa da mariposa em países asiáticos, onde a população tem este costume e respiratórias em pacientes com asma ocupacional. São necessários mais estudos para avaliar se há outros componentes proteicos envolvidos nestes processos, principalmente na fase adulta da Bm (mariposa).

2.3 CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS ALÉRGENOS

A Organização Mundial de Saúde (WAO) e a União Internacional das Sociedades Imunológicas (IUIS) definiram critérios para a caracterização um alérgeno, que incluem:

1. Definição das propriedades moleculares e estruturais:
 - Purificação da proteína alergênica;
 - Determinação da massa molecular;
 - Determinação da sequência de aminoácidos;
 - Produção de anticorpos específicos para o alérgeno;
2. Definição da importância do alérgeno em provocar reação IgE mediada:
 - Verificação da prevalência de anticorpos IgE específicos no soro de pacientes alérgicos (pelo menos 50 devem ser testados);
 - Demonstração da atividade biológica por TCA;
 - Investigação da antigenicidade (se a retirada do alérgeno do extrato reduz a capacidade de ligação com IgE);
 - Demonstração, quando possível, de que os alérgenos recombinantes tem atividade de ligação ao anticorpo IgE específico comparável ao alérgeno natural.

Um aspecto importante destes critérios é que eles devem permitir que outros autores possam identificar o mesmo alérgeno e realizar estudos comparativos. Para tal deve-se fornecer: a forma de preparo do extrato alergênico, o sequenciamento de aminoácidos para identificação da proteína e desenvolvimento de anticorpos monoclonais ou monoespecíficos desta proteína para a verificação de outros pesquisadores.

Outro aspecto relevante é a demonstração da atividade alergênica do alérgeno purificado, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Entre as técnicas usadas para medição de anticorpos IgE *in vitro* estão: RAST, CIE (contraimuno eletroforese), radioimunoensaio com alérgenos marcados, ELISA (imunoensaio enzimático) e *immunoblotting*. A escolha depende da averiguação da sensibilidade e eficácia dos métodos, que podem variar de acordo com inúmeros fatores. Independente da técnica, deve-se testar a prevalência de reatividade IgE específica sérica ao alérgeno em pelo menos 50 pacientes alérgicos selecionados aleatoriamente. Considera-se relevante quando a taxa de positividade for maior que 50%.

Quando são produzidos alérgenos recombinantes antes mesmo de se purificar o alérgeno natural, deve-se também demonstrar sua atividade biológica *in vivo*, por meio de TCA por punção (KING *et al.*, 1994).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental realizado no setor de medicina respiratória e alergia localizado no Complexo do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) e no ICC (Instituto Carlos Chagas).

3.2 CASUÍSTICA

Os sujeitos da pesquisa foram funcionários do CHC-UFPR, que totalizam 3757, selecionados entre os funcionários de limpeza e manutenção que somam 484 entre abril e maio de 2016 (FIGURA 2).

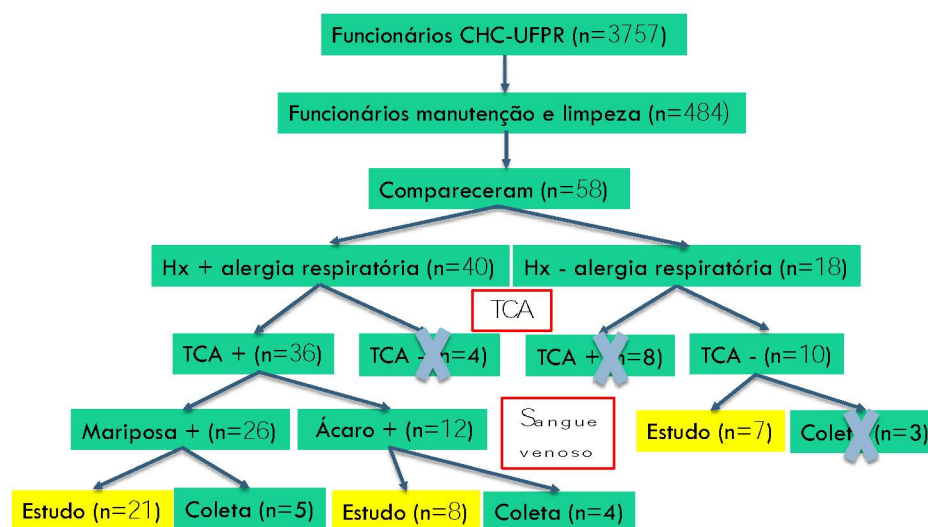


FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DE SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES DA AMOSTRA

FONTE: O Autor, 2018.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos os participantes que concordaram em participar do estudo assinando TCLE (termo de consentimento livre esclarecido), fizeram TCA e realizaram coleta de sangue por punção venosa para as análises laboratoriais (n=58).

3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos participantes com diagnóstico de alergia respiratória que apresentaram TCA negativo (n=4) para os alérgenos testados e os sujeitos com história negativa para alergia e tiveram TCA positivo para os mesmos (n=8).

3.5 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Constituiu-se de 36 sujeitos distribuídos em 3 grupos de acordo com diagnóstico de alergia respiratória (asma e/ou rinite) e positividade ao TCA da seguinte forma:

- Grupo 1 composto por 21 participantes com diagnóstico de rinite alérgica e/ou asma e cujo TCA foi positivo para extrato de mariposa
- Grupo 2 composto por 8 participantes com diagnóstico de rinite alérgica e/ou asma e cujo TCA foi positivo para extrato de ácaro da poeira
- Grupo 3 composto por 7 participantes sem doença alérgica respiratória e cujo TCA foi negativo para todos os alérgenos testados.

3.6 AMOSTRA E TÉCNICA DE AMOSTRAGEM

Foram selecionados sempre com a presença da pesquisadora três grupos cujo número foi idealizado a partir de estudos semelhantes para identificação de novas proteínas alergênicas (LIU et al., 2009; ZHONG, 2001), não tendo sido feito cálculo amostral. Não foi possível incluir mais sujeitos na amostra por limitações técnicas para realização dos imunoensaios.

3.7 PROCEDIMENTOS DA PESQUISA

Todos os procedimentos foram realizados pela pesquisadora, assim como os experimentos, em que se contou com o auxílio da equipe do laboratório de proteínas do ICC.

3.7.1 Dados clínicos e epidemiológicos

Durante a seleção dos pacientes, foram coletados dados pessoais como nome, sexo, data de nascimento, idade, procedência e feitos questionamentos sobre sintomas alérgicos, incluindo gravidade e frequência.

O diagnóstico clínico de asma intermitente, leve, moderada ou grave persistentes seguiu critérios clínicos conforme a classificação proposta pelo *NAEPP – National Asthma Education and Prevention Program* (2007).

O diagnóstico e a classificação da rinite em intermitente ou persistente, de acordo com a frequência dos sintomas e leve ou moderada/grave, conforme a intensidade dos sintomas foi feita segundo recomendações do *ARIA – Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma* (BOUSQUET *et al.*, 2008).

3.7.2 Preparo do extrato alergênico de mariposa

Os casulos de bicho-da-seda da espécie Bm foram coletados da indústria de fiação de seda Bratac® (Londrina-PR) e transportados em local seco e fresco até o setor de Alergia Pediátrica do CHC-UFPR em Curitiba, onde foram armazenados em caixa acrílica até a eclosão das pupas em mariposas. As asas, onde se localizam seus principais antígenos (KINO; OSHIMA, 1979), foram dissecadas e utilizadas no preparo do extrato alergênico.

A obtenção do extrato das asas da mariposa Bm foi realizada com base no sistema peso/volume (p/v), em que se extrai um peso conhecido em um volume especificado de fluido. A solução resultante pode ser concentrada ou diluída quando necessário (PATTERSON; GRAMMER; GREENBERGER, 1997).

O método escolhido foi o descrito por Lierl, Riordan e Fischer (1994), obedecendo os seguintes passos: asas de aproximadamente 100 mariposas adultas foram maceradas mecanicamente em pilão de cerâmica e imersas em éter etílico, para remoção de gorduras, até a completa evaporação do éter. O total de material obtido (2,8 g) foi homogeneizado em tampão de lise (PBS, pH 7,2, 5% Glicerol, 300 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 0,5 mM PMSF) (1:10, p/v) a 4°C por 48 h. O extrato foi clarificado por centrifugação dupla (por 15 min a 22.000 xg rotações e a 4°C), filtrado (utilizando filtros de 0,22 µm, da marca Millipore, Bedford, USA), distribuídos em alíquotas de 2 mL, que foram armazenadas em congelador a -20°C

para realização dos imunoenaios. Uma parte deste mesmo extrato (10 mL) foi diluída em glicerina (50%) (1:10) estéril e posteriormente armazenada em geladeira a 4°C para utilização nos testes cutâneos.

3.7.3 Obtenção do alérgeno arginina-quinase recombinante

Com o objetivo de ter um controle positivo para os imunoenaios, a sequência nucleotídica da arginina-quinase foi comprada a partir do GenBank/NCBI (ID NM_001043937), sintetizada comercialmente pela empresa GenScript® (Piscataway, EUA) e subclonada no pET28a (Novagen®, Madison, EUA), vetor para expressão em *Echerichia coli*, sob os sítios de restrição *BamHI* e *HindIII*, de modo a conter em sua extremidade N-terminal, uma sequência codificante de seis histidinas (6xHis), possibilitando sua purificação pela cromatografia de afinidade.

Após confirmação por sequenciamento, os vetores portando os genes íntegros foram utilizados para transformar células da *E. coli* BL21 (DE3), as quais foram crescidas a 37°C em meio LB (*Luria Bertani broth*) suplementado com canamicina (50 µg/mL), até atingir a uma densidade óptica 600_{nm} de 0,8.

A expressão da arginina-quinase foi induzida pela adição de isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (para uma concentração final de 0,5 mM), a 37°C por quatro horas. As células foram coletadas por centrifugação (a 2.800 g por 10 min a 4°C) e ressuspensas em 2 mL/g de células no tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 5% glicerol, 1 mM PMSF) e submetidas a 10 ciclos de 80 psi de pressão (microfluidificador M-110L, Microfluidics®), para lise total das células.

O extrato bacteriano foi clarificado por centrifugação (25.000g por 30min a 4°C) e o sobrenadante resultante foi filtrado (com filtro de 0,45 µm da marca Millipore®, Bedford, USA) e aplicado no sistema de cromatografia ÄKTA-UPC 100 (GE Healthcare Life Sciences®), portando a coluna His-trap HP (GE Healthcare Life Sciences®), que tem como metal imobilizado o níquel.

A proteína foi quantificada por meio do SDS-PAGE, por estimativa, tendo como referência uma proteína padrão (albumina de soro bovino, BSA – Sigma-Aldrich®) de massa conhecida (5 mg/mL) em diluições seriadas (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2 mg/mL).

3.7.4 TCA por puntura

Os pacientes selecionados foram submetidos a TCA por puntura com extrato alergênico de Bm (conforme descrito no item 3.7.2) e outros 6 aeroalérgenos que seguem: ácaros da poeira doméstica (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*), barata (*Blattella germanica*), epitélios de animais (gato e cão) e pólen de gramínea (*Lolium perenne*) Todos na concentração padronizada de 1:20 (IPI/ASAC, Brasil). Testado também a arginina-quinase recombinante, obtida de acordo com o item 3.7.3.

Obedecendo à seguinte técnica: cada participante foi colocado em posição confortável, realizada assepsia da superfície volar do antebraço direito com álcool etílico (70%), em seguida aplicada uma gota de cada extrato na pele, sendo o local marcado com caneta específica. O controle positivo foi realizado com histamina na concentração de 10 mg/mL (IPI/ASAC, Brasil) e o negativo com solução salina/glicerol a 50% (IPI/ASAC, Brasil) com intervalo de 3 cm de distância entre cada gota aplicada. Utilizou-se técnica de puntura com agulha estéril de 27 mm superficialmente na pele, em ângulo de 20°. Após 15 min, procedeu-se à leitura da reação com auxílio de régua milimetrada, considerado teste positivo quando a média entre os dois diâmetros perpendiculares da pápula foi maior ou igual a 3 mm (NELSON, 2011).

Nenhum dos pacientes estava em uso de antihistamínicos ou outras medicações que pudessem interferir no resultado do TCA na semana que antecedeu a sua realização.

3.7.5 Coleta de sangue venoso

Na mesma ocasião da realização dos testes cutâneos alérgicos, foram coletados 5 mL de sangue de todos os participantes por venopunção na região do antebraço e acondicionados em frascos de coleta para exame hematológico. Após a formação do coágulo, os tubos foram centrifugados a 2000 rotações por min por 10 min e armazenados a -20°C até a realização das dosagens de IgEs específicas pelo método ImmunoCAP ISAC® e dos imunoensaios.

3.7.6 Detecção de componentes alergênicos por ImmunoCAP ISAC

Amostras de soro dos 36 participantes foram enviadas para laboratório em São Paulo, onde foram analisadas pelo método ImmunoCAP ISAC (imunoensaio em fase sólida de multianálitos, ThermoFischer Scientific®), teste padrão automatizado *in vitro* para detecção de anticorpos IgE específicos. Que aplica a tecnologia de *microarray* proteico, cuja técnica consiste em dispor um painel de moléculas alergênicas sobre uma lâmina de vidro (75x25 mm) modificada quimicamente (através da adição de reagentes como os epoxisilanos ou a nitrocelulose, com a finalidade de melhorar a ligação proteica).

Cada alérgeno é colocado em triplicata para garantir a confiabilidade do teste; em seguida, adiciona-se 20 µL do soro a ser testado e os alérgenos do ensaio são reconhecidos pelos anticorpos IgE do paciente, que por sua vez, são detectados por anticorpos anti-IgE marcados (fluorescentes) adicionados posteriormente. Os valores são medidos por *scanner* a laser, gerando resultados semiquantitativos e classificados em unidades padronizadas, considerados positivos quando maior ou igual a 0,3 ISU (*ISAC standardized units*) (HARWANEGG; HILLER, 2005). São testados 112 componentes provenientes das mais diversas fontes alergênicas naturais e alérgenos recombinantes.

3.7.7 Imunodetecção

Para identificar os possíveis alérgenos de Bm as proteínas do extrato total concentradas 3 vezes e a arginina-quinase recombinante (controle positivo), foram aplicadas em géis de poliacrilamida (10%) para separação das proteínas por massa molecular (conforme descrito por Laemmli, 1970), transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences®) (a 20 volts por 40 min) em sistema semi-seco (Trans-Blot SD semi-dry transfer cell, Bio-Rad®) e bloqueadas com 5% (p/v) de leite em pó desnatado (MOLICO® - Nestlé) diluído em tampão PBS-T (PBS 1x, pH 7,4 com 0,15% Tween-20) por 1 h em temperatura ambiente.

Estas membranas foram fracionadas em tiras e incubadas inicialmente com *pool* de soros dos participantes do grupo 1 e 3. Depois de padronizados os parâmetros seguintes, foram incubadas com uma diluição de 1/30 dos soros individuais de cada participante do grupo 1, com alergia respiratória sensibilizados à *Bombyx mori* (n=21),

grupo 2, sensibilizados a ácaro da poeira doméstica (n=8) e controles saudáveis não atópicos (n=7), em PBS-T por 16 h a 4°C. Posteriormente, estas fitas foram incubadas com anti-IgE humana conjugada à fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich®) (1:5000) por 90 min em temperatura ambiente. Após cada etapa as membranas foram lavadas 5x com PBS-T.

A reação foi revelada em solução contendo 50 mg/mL BCIP (Bromo-Chloro-Indolyl Phosphate) e 50 mg/mL de NBT (Nitro Blue Tetrazolium) (Promega®, Madison, WI, USA) diluídas em 10 mL do tampão de fosfatase alcalina (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) por aproximadamente 60 s e interrompida com 10 mM EDTA em água destilada.

3.7.8 Espectrometria de massas

A fim de identificar os alérgenos específicos do extrato de asas da mariposa Bm por meio da espectrometria de massas, primeiramente foi realizado Wb (conforme descrito no item 3.7.7). Com este propósito, áreas da membrana contendo a pigmentação referente aos alérgenos detectados por meio das IgEs presente nos soros dos pacientes positivos e negativos (controle negativo), foram recortadas e lavadas em água ultrapura. Estes fragmentos de membrana foram então imersos numa solução (50%) de bicarbonato de amônio 50 mM por 15 min para despigmentação e secas naturalmente. A digestão dos alérgenos presentes nos fragmentos de membrana foi realizada pela adição da protease tripsina 12,5 ng/uL a 37°C por 16 h sob agitação. A solução foi evaporada no *speed vac* por 45 min a 45°C, seguido da adição de acetona com incubação por 30 min em temperatura ambiente, sob agitação constante.

Após a remoção do sobrenadante as membranas foram novamente secas no *speed vac* por 30 min e adicionados 50 uL de bicarbonato de amônio (50 mM) em cada, seguido de sonicação (5 min), sendo o sobrenadante transferido para microtubos *Eppendorf*® juntamente com a acetona. Esse último procedimento foi repetido 2 vezes. O sobrenadante obtido foi submetido ao *stage tip* para purificação dos peptídeos, os quais foram aplicados no sistema MALDI-TOF (espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL, Thermo Scientific), para leitura e posterior identificação destes peptídeos que compõem os alérgenos a serem identificados.

3.7.9 Cromatografia de imunoafinidade

A fim de isolar e identificar possíveis alérgenos do extrato total de asas de Bm foi desenvolvida uma técnica de cromatografia por imunoafinidade. Realizada a partir da captura destas proteínas por meio de IgEs específicas presentes no soro de pacientes sensibilizados à mariposa. Procedimento que ocorreu com base na interação de sucessivas moléculas (FIGURA 3), tendo como suporte sólido a resina de níquel (Ni Sepharose 6 Fast flow - GE) ligada à proteína A recombinante (30 mg/mL de resina). Esse complexo foi incubado com o anticorpo humanizado anti-IgE (1 ug/mL) por 16 h e posteriormente, com o *pool* de soro (1:10) por 8h, e então, incubado com o extrato de *Bombyx mori* (1:1) por 16 h. Todas as incubações foram realizadas a 4°C com agitação constante, no tampão de ligação (PBS acrescido de 0,05% tween-20), incluindo as lavagens.

Os alérgenos foram recuperados através de eluições com dois tampões diferentes (PBS-T, 300mM NaCl, 0,5 M Imidazol e 50 mM glicina pH 2,5). Todas as centrifugações foram realizadas a 300g por 1 min em temperatura ambiente. Cada fração foi analisada por SDS-PAGE e posteriormente por Wb.

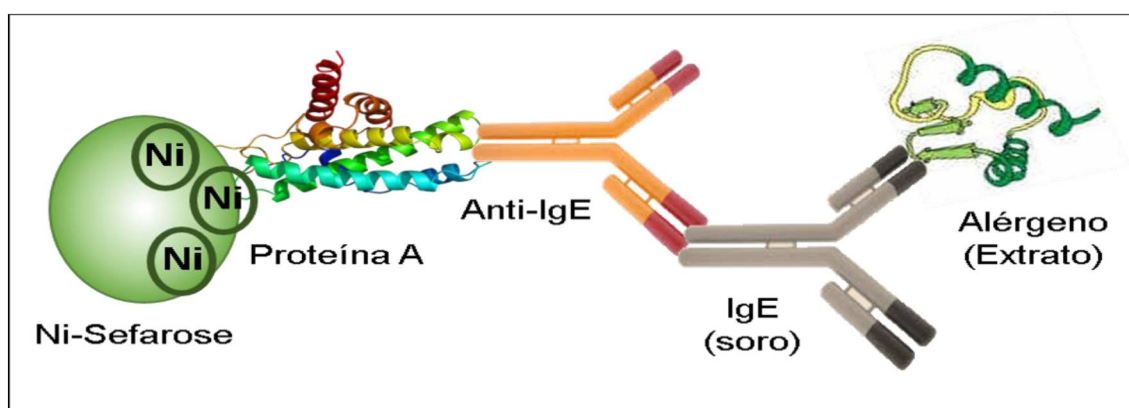


FIGURA 3 – MOLÉCULAS DO COMPLEXO PARA DETECÇÃO E CAPTURA DOS ALÉRGENOS A PARTIR DO EXTRATO DE *BOMBYX MORI*.

FONTE: Claudemir de Souza, 2017

3.7.10 Identificação das proteínas alergênicas

A fim de identificar os potenciais alérgenos reagentes nos ensaios de Wb, foram realizadas buscas nos bancos de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e *Protein Data Bank* (PDB) por proteínas de Bm que apresentavam

massa molecular aproximada às proteínas reagentes nos imunoensaios em pelo menos 50% dos pacientes (considerados alérgenos *major*, segundo Canonica e cols, 2013) e que foram passíveis de purificação a partir da IgE do soro destes mesmos pacientes. O critério para seleção das várias proteínas foi a possibilidade de estarem presentes na asa da mariposa adulta e/ou já relacionadas com processos alérgicos.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi feita análise descritiva para os dados clínicos, epidemiológicos e resultados de testes alérgicos e imunoensaios.

3.9 ÉTICA EM PESQUISA

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do CHC-UFPR em 27 de abril de 2014, sob registro CAAE 27605914.2.0000.0096 (ANEXO 1) conforme as normas da resolução CNS 466/2012. O estudo foi iniciado após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE 1).

3.10 FOMENTO PARA PESQUISA

A pesquisa teve apoio financeiro do ICC para a compra da proteína arginina-quinase recombinante e realização de todos os testes laboratoriais descritos neste estudo.

A parte clínica da pesquisa foi conduzida no CHC - UFPR e obteve fomento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, com concessão de bolsa de estudo à pesquisadora por período de 3 anos.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA DE ESTUDO

A amostra foi constituída por 3 grupos: o primeiro com 21 indivíduos diagnosticados com asma e/ou rinite e que apresentaram TCA positivo para Bm; o segundo contendo 8 participantes também diagnosticados com doença alérgica respiratória, mas que apresentaram TCA positivo para ácaros da poeira e o terceiro formado por 7 sujeitos com história negativa para quaisquer alergias e cujo teste cutâneo foi negativo para os alérgenos testados. Na TABELA 1 são apresentados os seus dados clínicos e epidemiológicos.

TABELA 1 – DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS PARTICIPANTES (n=36)

CARACTERÍSTICAS	GRUPO 1 n 21	GRUPO 2 n 8	GRUPO 3 n 7
Idade (anos)*	40	47	48,5
Sexo (M/F)	15:6	2:6	3:4
Asma	6	2	0
Intermitente/Leve	2	2	
Moderada	4	0	
Rinite	21	8	0
Leve	9	4	
Moderada/Grave	12	4	
Sintomas oculares	12	7	0
Dermatite atópica	2	0	0

* Expressa em mediana

FONTE: O autor (2018)

As frequências de positividade ao TCA para os extratos alergênicos totais dispostos em ordem alfabética: *Blattella germanica*, *Blomia tropicalis*, *Bombyx mori*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, epitélio de cão, epitélio de gato e *Lolium perene*, além da arginina-quinase recombinante e os diâmetros das pápulas expresso em média estão apresentados na TABELA 2.

TABELA 2 – FREQUÊNCIA DE POSITIVIDADE E REATIVIDADE AO TCA COM DIFERENTES ALÉRGENOS NOS GRUPOS 1 (n 21) E 2 (n 8)

ALÉRGENOS	n 21	Diâmetros médios reação	n 8	Diâmetros médios reação
Arginina-quinase	6	3,5	0	
<i>Blattella germanica</i>	4	3,5	4	3,1
<i>Blomia tropicalis</i>	13	4,2	6	3,6
<i>Bombyx mori</i>	21	3,6	0	
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	11	4,6	7	5,3
Epitélio cão	7	4,5	1	3
Epitélio gato	1	4,5	1	3
<i>Lolium perenne</i>	9	5,8	3	3,8

FONTE: O autor (2018)

Quatro pacientes apresentaram TCA positivo exclusivamente para mariposa, com reatividade cutânea média de 3,7. Enquanto os 17 demais tinham sensibilidade a algum outro extrato alergênico. Nenhum dos quatro indivíduos sensíveis somente à mariposa apresentou reatividade à arginina-quinase recombinante pelo TCA.

4.2 IMMUNOCAP ISAC

Para refinar a análise sobre o perfil de sensibilidade alergênica, todos os participantes do estudo foram submetidos ao teste molecular ImmunoCAP ISAC, que identificou a frequência de positividade a 112 componentes alergênicos. Foram considerados positivos quando $> 0,3$ (ISU). Na TABELA 3 estão destacadas as frequências de positividade aos principais alérgenos inaláveis conforme o grupo. Os referentes a fontes alimentares não foram descritos, pois não interessam aos objetivos deste estudo. Nos pacientes controles, correspondentes ao grupo 3, foi encontrado epítipo Phl p 4 positivo em valor próximo ao mínimo (0,4 ISU) em um dos indivíduos testados, portanto este dado não foi acrescentado à tabela.

TABELA 3 – FREQUÊNCIA DE POSITIVIDADE AOS COMPONENTES
ALERGÊNICOS INALANTES POR IMMUNOCAP ISAC NOS
NOS GRUPOS 1 E 2

FONTE ALERGÊNICA	COMPONENTE ALERGÊNICO	GRUPO 1 n 21	GRUPO 2 n 8
Ácaros da poeira			
<i>Blomia tropicalis</i>	Blo t 5	9	3
<i>Dermatophagoides</i>	Der f 1	8	7
<i>farinae</i>	Der f 2	7	6
<i>Dermatophagoides</i>	Der p 1	8	7
<i>pteronyssinus</i>	Der p 2	6	5
	Der p 10	4	2
<i>Lepidoglyphus</i>	Lep d 2	6	4
<i>destructor</i>			
Animais			
Barata	Bla g 7	3	1
(<i>Blattella</i> <i>germanica</i>)			
Cão	Can f 2	1	0
(<i>Canis familiaris</i>)	Can f 5	1	3
Gato	Fel d 1	2	1
(<i>Felis domesticus</i>)			
Polens gramíneas			
<i>Cynodon dactylon</i>	Cyn d 1	8	0
<i>Phleum pratense</i>	Phl p 1	5	1
	Phl p 4	6	0
	Phl p 5	1	0
	Phl p 7	0	1

FONTE: O autor (2018)

NOTA: nos participantes do grupo 3, Phl p 4 foi o único positivo em um indivíduo, em valor próximo ao negativo

Os alérgenos foram classificados conforme a fonte em: ácaros da poeira doméstica (incluídos *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Lepidoglyphus destructor*); animais (incluídos barata da espécie *Blattella germanica*, cão e gato correspondentes a *Canis familiaris* e *Felis domesticus* respectivamente. Finalmente polens de gramíneas, que são os mais encontrados na

região Sul do país, onde foi realizado o estudo como segue: *Cynodon dactylon* (grama bermudas e *Phleum pratense* (grama timóteo).

Os componentes mais frequentemente encontrados no grupo 1 foram os ácaros da poeira, sendo Blo t 5 o primeiro, seguido de Der p 1 e Der f 1. Der p 10, que é uma tropomiosina, foi encontrada em 4 participantes. Com relação aos animais, componente da barata (Bla g 7) que também é uma tropomiosina e pode ter reatividade cruzada com a do ácaro (Der p 10) foi o mais frequente, seguido do gato e cão. Os polens de gramíneas tiveram positividade significativa: sendo o principal Cyn d 1, seguido dos relacionados ao *Phleum pratense*.

Dos 4 participantes do grupo 1 que apresentaram sensibilidade exclusiva para mariposa pelo TCA, em apenas 1 foi encontrado componente de gramínea Phl p 4 em valor baixo (0,4), nos demais, o teste foi negativo para todos os outros componentes alergênicos.

Os componentes mais frequentemente encontrados no grupo 2, foram os ácaros da poeira. Der p 10, tropomiosina que foi encontrada em 2 sujeitos. Com relação aos animais, componente do cão (Can f 5) foi o mais frequente encontrado, seguido do gato (Fel d 1) e barata (Bla g 7). Quanto aos polens de gramíneas, apenas 1 paciente apresentou sensibilidade a dois componentes do *Phleum pratense*: Phl p 1 e Phl p 7.

4.3 CROMATOGRAPHIA POR IMUNOAFINIDADE

Com o objetivo de purificar o extrato bruto de Bm, foi realizada cromatografia por imunoafinidade. Foram realizadas diversas tentativas de padronização de cada etapa deste processo. Segue a análise resultante por SDS-PAGE em que a proteína A foi acoplada ao anticorpo anti-IgE, ligado, por sua vez às IgEs presentes no soro dos pacientes sensibilizados à mariposa, que se ligaram finalmente ao extrato total de Bm.

Verificou-se que em todas as condições testadas foi possível observar a presença de proteínas. Observa-se que nas canaletas referentes ao controle (resina e extrato) não há presença de proteínas, o que mostra que os anticorpos foram eficientes na captura dos alérgenos do extrato da mariposa, não havendo indícios de ligações inespecíficas. Algumas proteínas não foram capazes de eluir completamente da resina (FIGURA 4).

Testou-se o extrato concentrado 3x (condição A), extrato normal (condição B) e extrato diluído 3x (condição C). Destas, a condição A foi a que apresentou melhor desempenho, pois há maior nitidez das bandas e maior quantidade de proteína purificada (FIGURA 4).

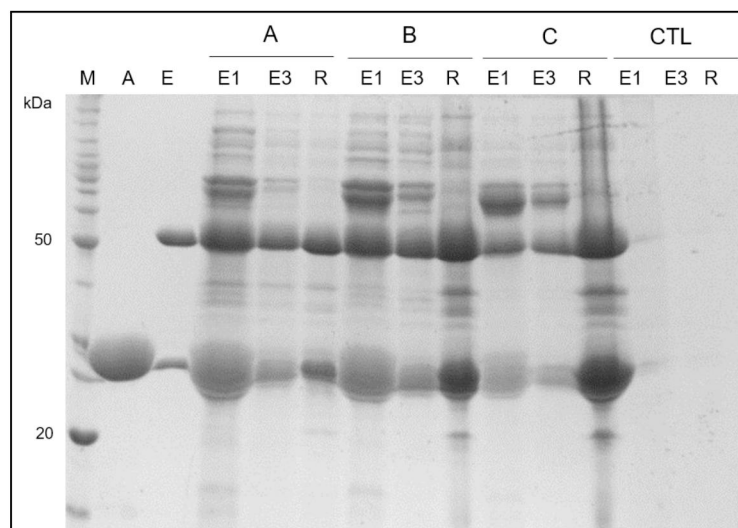


FIGURA 4 - SDS-PAGE DA CROMATOGRAFIA POR IMUNOAFINIDADE COM PROTEÍNA A RECOMBINANTE ACOPLADA EM RESINA DE NÍQUEL

NOTA: A, B e C) Diferentes condições testadas. CTL) Controle da purificação (incubação da resina com o extrato de mariposa nas mesmas condições das demais). M) Marcador de massa molecular (*Bench Marker*). A) Proteína A. E) Anticorpo anti-IgE. E1) Primeira eluição realizada com o tampão B. E3) Terceira eluição realizada em tampão ácido. R) Resina após as três eluições.

FONTE: O autor (2018)

4.4 IMUNOENSAIOS

Foram realizados vários experimentos para avaliar as condições ideais de Wb, na tentativa de padronizar os parâmetros a serem utilizados. Após o uso de diversas diluições de extrato de Bm, de anticorpos e *pool* de soros dos pacientes, concluiu-se que os que apresentaram melhor definição foram os demonstrados na FIGURA 5, destacado em vermelho para a concentração intermediária. Sendo que maiores ou menores concentrações levaram à piora na nitidez (com imagem mais borrada e mais apagada respectivamente).

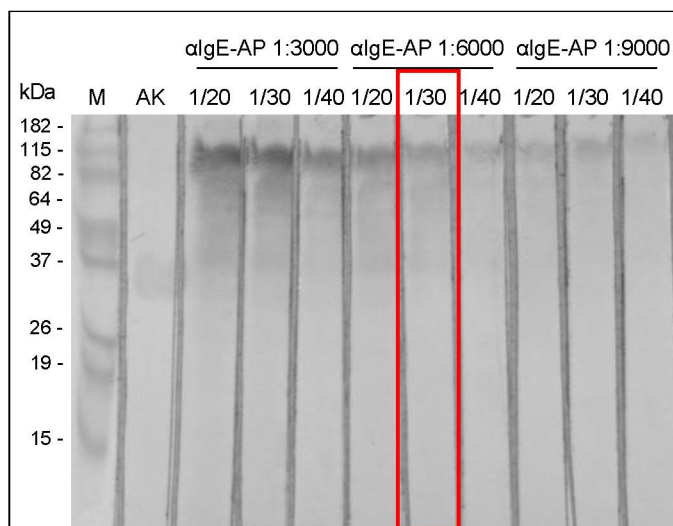


FIGURA 5 – PADRONIZAÇÃO DE *WESTERN BLOT* PARA IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS ALERGÊNICAS DE *BOMBYX MORI*

NOTA: Testes utilizando diferentes diluições do *pool* de soros dos pacientes do grupo 1 e do conjugado α lgE-AP. AK) Arginina-quinase recombinante, controle positivo. M) marcador massa molecular padrão pré-corado (*Bench marker*).

FONTE: O Autor (2018)

Foi comparado anticorpo anti-IgG com anti-IgE humana ambos ligados à peroxidase (AP) nos grupos 1 e 3 utilizando *pool* de soros como segue na FIGURA 6. Em relação ao ensaio com a anti-IgG, é possível notar que ocorrem muitas reações inespecíficas, tanto com os soros dos pacientes positivos (grupo 1), quanto dos negativos (grupo 3). Observa-se que há poucas diferenças no perfil de bandas entre estas amostras. Na comparação entre o extrato total e purificado, detecta-se um maior número de bandas reagentes no extrato total.

Em relação ao ensaio com a anti-IgE, nota-se que houve reatividade a um número menor de bandas em relação ao ensaio com anti-IgG. Houve reatividade maior nos pacientes sensíveis à Bm (grupo 1) comparando-se aos controles negativos (grupo 3). Sendo que no extrato purificado, só houve reatividade nos positivos (grupo 1). Foram encontradas as seguintes proteínas correspondentes às alturas aproximadas do marcador de massa molecular no *pool* de soros dos pacientes positivos (grupo 1) utilizando anticorpo anti-IgE contra o extrato bruto de Bm: 150, 80, 66, 50, 45, 40, 37 e 30 kDa. Ao passo que com o extrato purificado, as mesmas alturas de banda foram visualizadas, as de 80 e 50 kDa mais intensas, porém as demais com intensidade mais fraca, exceto pelas de 150 e 30 kDa, que não apareceram (FIGURA 6).

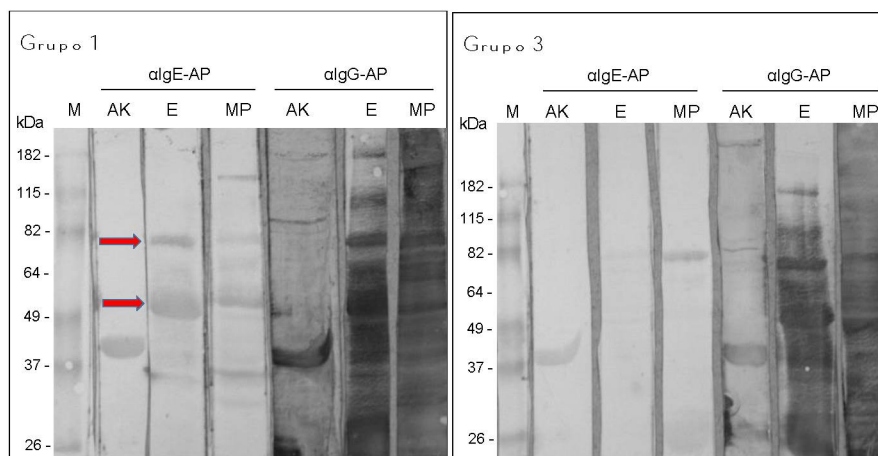


FIGURA 6 - COMPARAÇÃO NA DETECÇÃO DE IgE E IgGS ENTRE *POOL* DE SOROS DO GRUPO 1 E 3 POR MEIO DE WESTERN BLOT

NOTA: anticorpos de camundongos conjugados com fosfatase alcalina anti-IgE humana (α IgE-AP) e anti-IgG humana (α IgG-AP) como anticorpos secundários. AK) Arginina-quinase recombinante, controle positivo. E) Extrato purificado imobilizado na membrana. MP) Extrato bruto imobilizado na membrana. M) Marcador de massa molecular padrão pré-corado (*Bench marker*). As setas indicam as bandas mais fortes encontradas na reação com o extrato purificado nos participantes do grupo 1.

FONTE: O autor (2018)

Todas as proteínas com massa molecular aproximada encontradas por Wb realizado a partir do extrato total de mariposa e *pool* de soros positivos dos pacientes do grupo 1 (FIGURA 6) também apareceram no SDS-PAGE da purificação (FIGURA 4).

Inicialmente foram realizados Wb a partir do *pool* de soros, após a padronização, foram testados os soros de cada paciente individualmente (FIGURAS 6, 7, 8, 9 e 10). Optou-se por utilizar o extrato total para estes imunoensaios, pois houve reatividade a número maior de proteínas em relação aos do extrato purificado na análise por Wb do *pool*. Nos pacientes do grupo 1 foram identificadas 18 alturas aproximadas de bandas que seguem: 185, 182, 150, 115, 100, 90, 80, 66, 64, 60, 55, 50, 45, 40, 37, 35, 30 e 27 kDa. Cada participante apresentou um perfil diferente de reatividade, com diferentes padrões de bandas e intensidade de reação (FIGURAS 7, 8 e 9). Os pacientes 5, 9 e 10 demonstraram reatividade a um maior número de bandas, em comparação aos demais, além de forte intensidade de reação (FIGURAS 7 e 8). Os indivíduos 16 e 19 não apresentaram nenhuma reação ao imunoensaio (FIGURA 9).

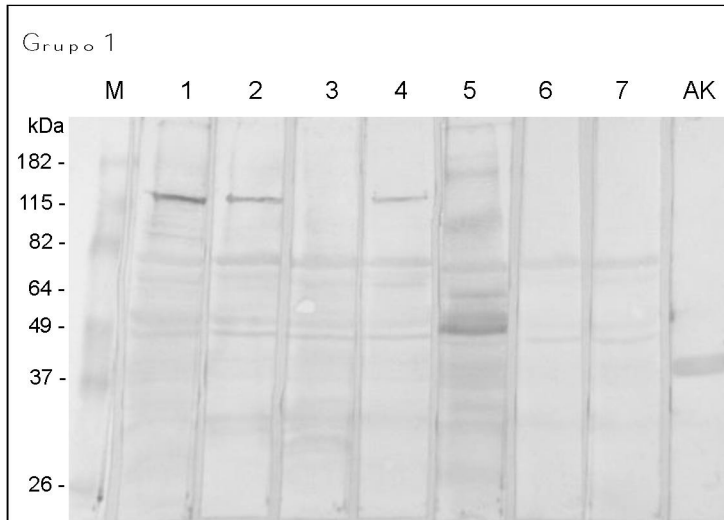


FIGURA 7 – *WESTERN BLOT* COM SOROS DO GRUPO 1 (1-7)

NOTA: Membrana incubada com soro de sete dos 21 participantes do grupo 1 (1-7). AK) Arginina-quinase recombinante, controle positivo da reação. M) Marcador de massa molecular padrão pré-corado (*Bench marker*).

FONTE: O autor (2018)

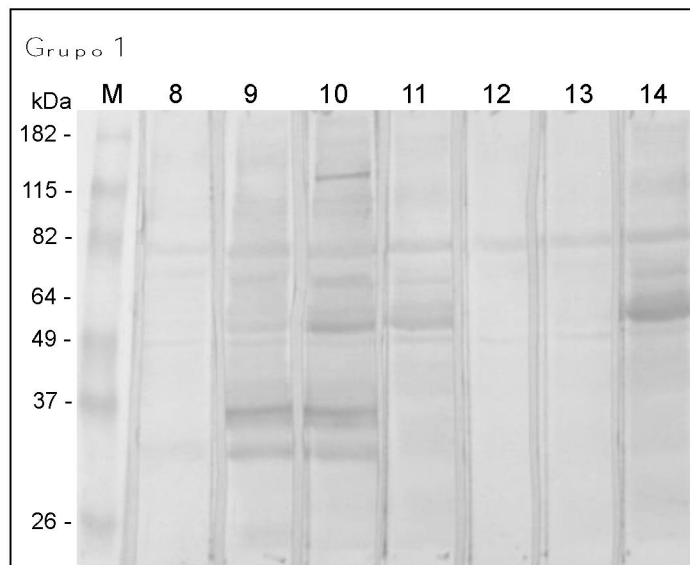


FIGURA 8 – *WESTERN BLOT* COM SOROS DO GRUPO 1 (8-14)

NOTA: Membrana incubada com soro de sete dos 21 participantes do grupo 1 (8-14). AK) Arginina-quinase recombinante, controle positivo da reação. M) Marcador de massa molecular padrão pré-corado (*Bench marker*).

FONTE: O autor (2018)

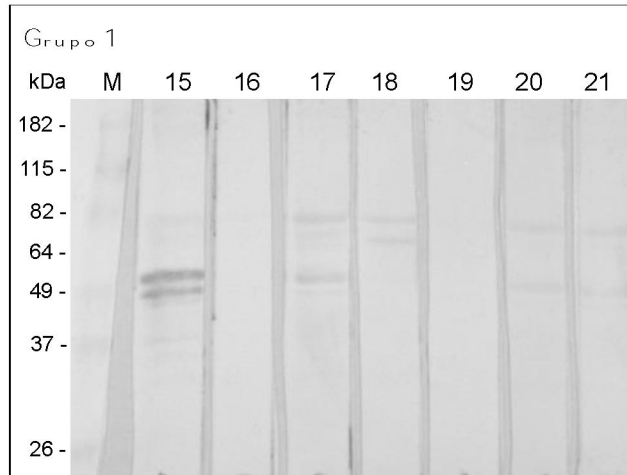


FIGURA 9 – *WESTERN BLOT* COM SOROS DO GRUPO 1 (15-21)

NOTA: Membrana incubada com soro de sete dos 21 participantes do grupo 1 (15-21). AK) Arginina-quinase recombinante, controle positivo da reação. M) Marcador de massa molecular padrão pré-corado (*Bench marker*).

FONTE: O autor (2018)

O mesmo ocorreu com os pacientes do grupo 2, que apresentaram diferentes perfis de bandas e diferentes intensidades de reação. As possíveis proteínas demonstradas pelo Wb dos pacientes sensíveis ao açúcar foram as seguintes: 150, 100, 66, 64, 55, 50, 40, 37, 30 e 27 kDa (FIGURA 10).

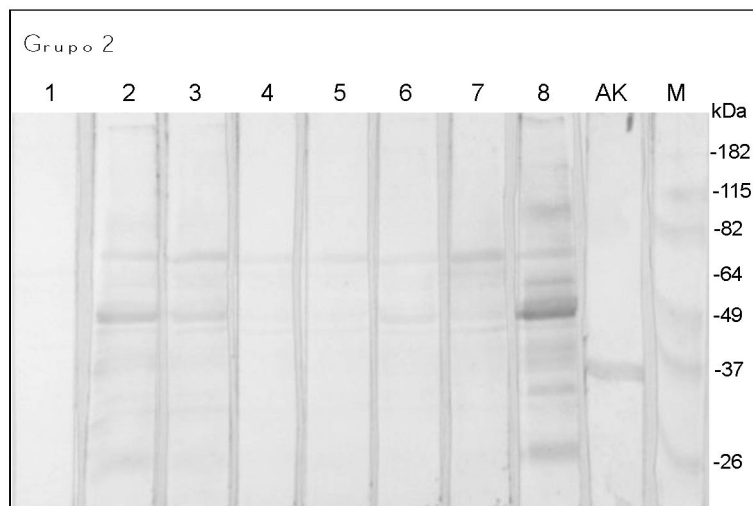


FIGURA 10 – *WESTERN BLOT* CONTROLE COM SOROS DO GRUPO 2

NOTA: Membrana incubada com soro de oito pacientes referentes ao grupo 2 (1-8). AK) Arginina-quinase recombinante, controle positivo da reação. M) Marcador de massa molecular padrão pré-corado (*Bench marker*).

FONTE: O autor (2018)

Todas as proteínas encontradas no grupo 2 foram da mesma maneira visualizadas nos pacientes sensíveis à mariposa do grupo 1, porém em menor intensidade. Sendo que as correspondentes às alturas de 66 e 50 kDa foram encontradas em mais de 50% dos pacientes, consideradas *major* para ambos os grupos 1 e 2 (sensibilizados à mariposa e ácaro).

Por outro lado, a proteína de 80 kDa foi encontrada em todos os indivíduos sensibilizados à mariposa e em nenhum dos sensíveis ao ácaro da poeira. A proteína de 45 kDa da mesma maneira foi reativa em 84,2% dos participantes do grupo 1 e não foi visualizada nos do grupo 2. O gráfico a seguir demonstra em frequência de positividade todas as alturas de bandas encontradas em ambos os grupos (FIGURA 11).

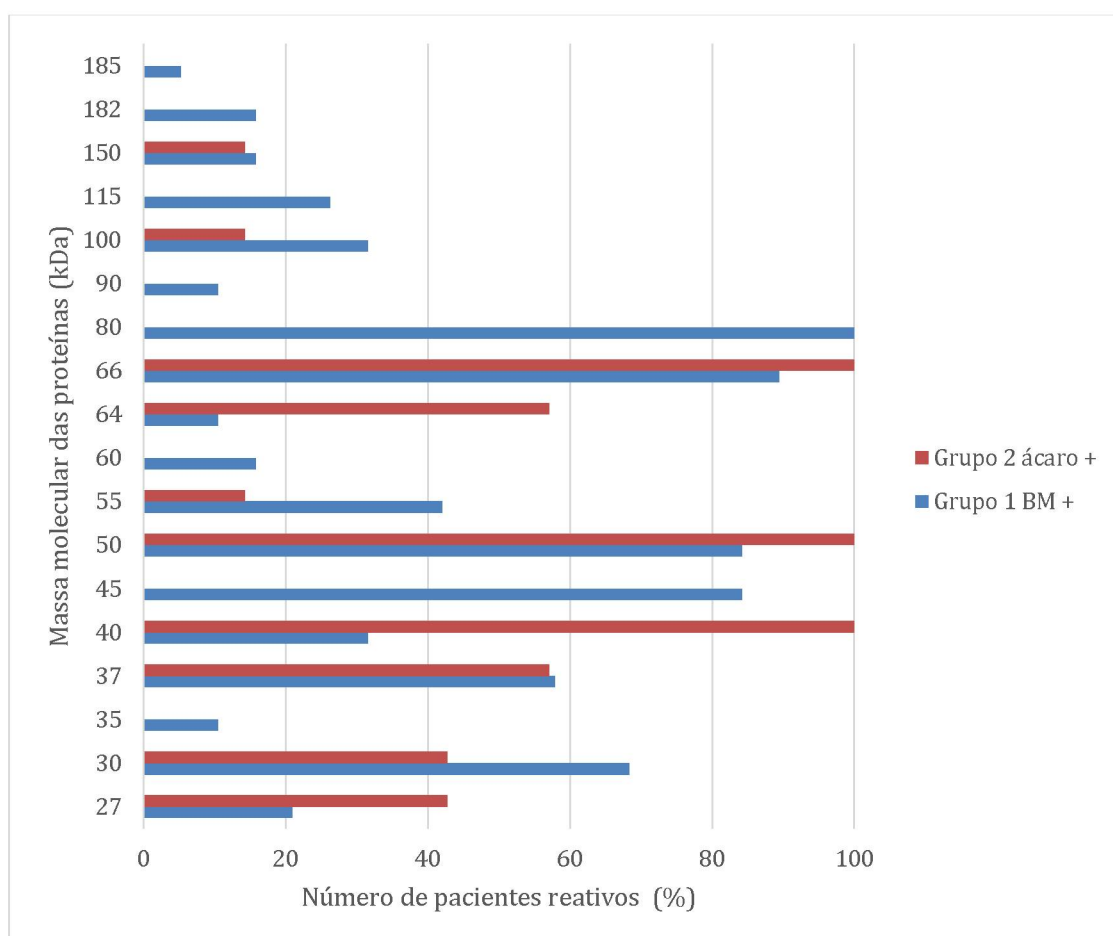


FIGURA 11 – GRÁFICO SOBRE A PORCENTAGEM DE POSITIVIDADE DAS POSSÍVEIS PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT NOS PARTICIPANTES DOS GRUPOS 1 E 2

FONTE: O autor (2018)

Os sujeitos incluídos no grupo 3, que não tinham diagnóstico de doença alérgica respiratória e cujos TCA foram negativos para todos os antígenos testados, considerados controles negativos, não apresentaram reatividade aos imunoensaios (FIGURA 12).

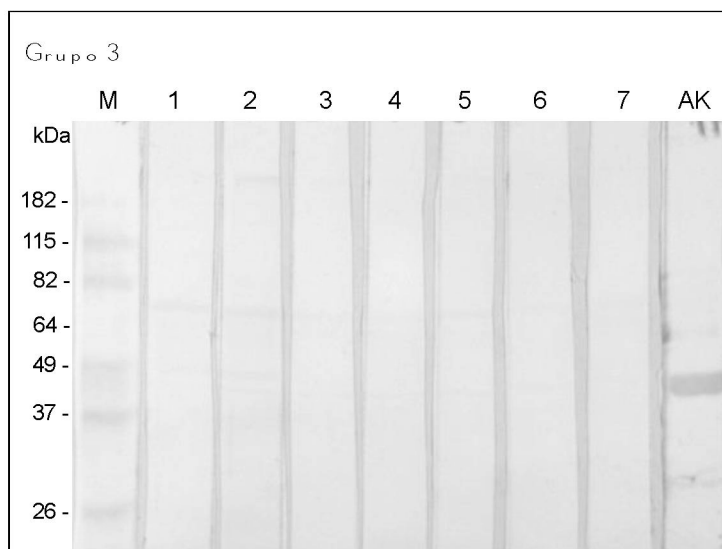


FIGURA 12 – WESTERN BLOT CONTROLE COM SOROS DO GRUPO 3

NOTA: Membrana incubada com soro de sete indivíduos referentes ao grupo 3 (1-7). AK) Arginina-quinase recombinante, controle positivo da reação. M) Marcador de massa molecular padrão pré-corado (*Bench marker*).

FONTE: O autor (2018)

4.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Foi optado por encaminhar para análise a membrana pós purificação, pois o gel do extrato total de mariposa é muito rico em proteínas o que poderia interferir negativamente nos resultados, dificultando sua interpretação. Porém, devido ao *cut-off* estabelecido pelo sistema de análises do espectrômetro de massas, somente foi possível a obtenção de 2 proteínas cujas sequências de dados foram confiáveis: vitelogenina e actina (FIGURAS 13 e 14). Sendo que somente a primeira apresentou quantidade de peptídeos superior na análise feita a partir da membrana resultante do Wb com extrato bruto de mariposa e *pool* de soros dos participantes do grupo 1, comparando-se ao *pool* de soros dos indivíduos do grupo 3, correspondentes aos controles negativos.

1- **Q27309**; H9J4Z5

Number of amino acids: 1782

Molecular weight: 203 kDa

>NP_001037309.1 vitellogenin precursor [Bombyx mori] 100% identidade

```

10      20      30      40      50      60
MKLFVLAAIL AAVSSDRFSS QSQTGGQTY PFWQVVGKQY RYEVTSRITLA HLQEGFSSGS

70      80      90     100     110     120
AFKAQFTIRV KSPGRLQAKL ENFQHGHNFE QLPDPREL EV DLKYQFTFNI DKVFEIETDG

130     140     150     160     170     180
GRIVSLDFFT SVFVPQENLI KGLISALQLD TSAHRVIHDS QNNYDRBQQQ GLFRKMETDV

190     200     210     220     230     240
TGDCELTLYV SPVASEVRRE LPKFANEQDF VEVTKSTNYG HCHHRVAYHE GVFPVGARWTG

250     260     270     280     290     300
TAHKTQEQQL IGRATYSRIL TGKEGPIYKA ETTSTVHVHP HLYGKQKAEV YSHVHMELIS

310     320     330     340     350     360
VDQDSGAWEF RAGAMRPAQS ILYSLSTKQM TKHYESSSSS SSSSESHFNF PEQHEHPHQ3

370     380     390     400     410     420
NQRSRRSYMR SKLVTVHKVL KKRNSSESSG SSSSADSSS TYINDIPDI DEPAYAALYM

430     440     450     460     470     480
SPQPHADKFK NAMNAQKILQ DIAQLQGNEN NMFKSDFLSK FNILVRLIAS MSTEQLSQTS

490     500     510     520     530     540
RSIETAKTNS NIIKSDMMMI FRDGVYQAGT LFAFKIQSW IENKKIQEEE AAQVVALPR

550     560     570     580     590     600
TLRYPTKQIM TQFFNFARBF AVKDQMFNS SALMAATKLI NLGQVNNYTA HSYPTHTMYG

610     620     630     640     650     660
RLTHKHDAFV LEEILPTLAA DLKATVEYKD STKAQVYIQA IGNLGHREIL KVFAPYLEGK

670     680     690     700     710     720
VEISTYLRTM IVKHLKTLAK LRDRHVRAVL FSILNKTABF YEVVAAIQS IFISHTGEM

730     740     750     760     770     780
MQMAAENTHN DFSVEVRASL KSALLSAEL QHFRNFYLSR TAQAARYLVT NEEFGYQHSF

790     800     810     820     830     840
KFIDDSYDEB NDIGTFVISH IGSEDSLLPK DFKIVTNSKG GAWERNITRA SFSSAERFLD

850     860     870     880     890     900
YLRDSVFAFH FKEDRAHKYS AEKIAKLINI KNDEEPELEA SFYVDFMNNQ RLFSFSES DL

910     920     930     940     950     960
QQLSQYISBY MKKVESGAEK HYTKVYNQDQ VSIMFPVASG MPFIKPKYKEF AVIHQPSKLG

GKSFSPSKDN KYEANMIKD VQFTYAINID GNVGMDTLS NQYSSVGVDN KLQFNIPFFK

1030    1040    1050    1060    1070    1080
GIEIKSGLIK FRVEPLHPDQ DQTLVHYSVW PYSAQSKKDS LVASIQDEAT KIVERRSKV/F

1090    1100    1110    1120    1130    1140
SVDISKYQST HAVIYAQGYT YSSIWENFGA KFTSRDYFTN LASLLTQEDI ALTHENLRLH

1150    1160    1170    1180    1190    1200
CKQSQSKALT ITAYYDEYIN QQNSGILTDA TDRNDLSNS ETRAEMVKL VSAGINKARV

1210    1220    1230    1240    1250    1260
KVDLSASFEE GSQDQNYVLT GTWGDSPVDS KVGMLFAST KSATQAWQI NAVFATTKEE

1270    1280    1290    1300    1310    1320
IHSLSFSKPL QSDLRAPFGM HFYKQSGEI RVSGSFDRTK KYTTELENHP LAKQCSQQT

1330    1340    1350    1360    1370    1380
LNNEYQDSCH KALVMAHAD HVEFSVSFQD MSPQYRNFSY HTYALYEYLG YWYTEANPLK

1390    1400    1410    1420    1430    1440
LTQNGHMDFK IDFSYDFRTY TVDIASPSGE ARNRDMPAT MAPGALSFYQ ELKAYELVAN

1450    1460    1470    1480    1490    1500
YFTGHQYQPY CSIDGTRIHT FSNRSYEYEL SRSWHVMDQ ESTQRGNWHE LAILSRRAQR

1510    1520    1530    1540    1550    1560
DQQEIIYISYK SESGQDLEIE IQPASGDSAY QVVKVTTNTKK ITDDDLTMYW DDVKEQFFLQ

1570    1580    1590    1600    1610    1620
YHTHKDGLV INIEDDRAIRA IYDQRFVVF TQDYRNSTG ICGRMSGEQR DDYLTPEGLV

1630    1640    1650    1660    1670    1680
DKPELYAAAT SIMENSDFK TQELKALATQ QAVYPEYKYT SILASDPTWQ EESQSCGEDQ

1690    1700    1710    1720    1730    1740
WQSETVYKSR SYDKHKACE VRQGVQFYEN HGDICITTSR VPSCQSHCA GDYKIQHVQV

1750    1760    1770    1780
TCKSKLDHDF RMYKEQLKKG QNPEVSGIPS VKQFKVETC QP

```

FIGURA 13 - SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA VITELOGENINA

FONTE: Espectrômetro de massas (ICC), 2017

2- **P84183**; P07836; P04829; H9JWN1; H9J7T4; H9JX0; P07837; H9J7T5

Number of amino acids: 376

Molecular weight: 42 kDa

>AGR44827.1 actin-4 [Bombyx mori] 99% identidade

```

10      20      30      40      50      60
MCDEEVAALV VDNQSGMCKA GFAGDDAPRA VFPSIVGRPR HQGVNVMGMQ KDSYVGDQAQ

70      80      90     100     110     120
SKRGILTLKY PIEHGIVTNW DDMKIWHHT FYNELRVAPE EHPVLLTEAP LNPKANREKM

130     140     150     160     170     180
TQIMEFTFNT PAMYVAIQAV LSLYASGRIT GIVLDSGDGV SHTVPVYEGY ALPHAILRLD

190     200     210     220     230     240
LAGRDLTDYL MKILTERGYS FTTTAEREIV RDIKEKLCYV ALDFEQEMAT AASSSSLEKS

250     260     270     280     290     300
YELPDGQVIT IGNERFRCPE ALFQPSFLGM EACGIHETTY NSIMKCDVDI RKDLYANTVL

310     320     330     340     350     360
SGGTTYMVG IADRMQKEITA LAPSTMKIKI IAPPERKYSV WIGGSILASL STFQQMWISK

370
QEYDESGPSI VHRKCF

```

FIGURA 14 - SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA ACTINA

FONTE: Espectrômetro de massas (ICC), 2017

4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS POTENCIAIS ALÉRGENOS

As proteínas reagentes em pelo menos 50% dos imunoenaios e presentes na cromatografia de imunoafinidade, consideradas então como potenciais alérgenos,

foram identificadas de acordo com proteínas de Bm já caracterizadas e depositadas nos bancos de dados, cujas massas moleculares foram semelhantes às encontradas por Wb.

No NCBI, através da busca por *Bombyx mori*, pelo *taxonomy* foram obtidos 29.332 itens. Deste total, cerca de 3.000 itens continham publicações relacionadas. Destes foram selecionados 69 artigos para análise; com base na massa molecular, localização, função e ciclo de vida, um total de 18 proteínas foram cogitadas para a identificação dos potenciais alérgenos reagentes nos ensaios de Wb e cromatografia de imunoafinidade.

Como várias destas proteínas selecionadas apresentam a mesma massa molecular, priorizou-se aquelas já descritas como alérgenos *major*, a fim de aferir uma identificação mais próxima possível da proteína em questão. A TABELA 4 mostra os possíveis alérgenos identificados nos imunoenaios e classificados como mencionado acima. Foram selecionadas as 6 candidatas com as seguintes massas moleculares: 80, 66, 50, 45, 37 e 30 kDa.

TABELA 4 - PRINCIPAIS PROTEÍNAS SELECIONADAS A PARTIR DO EXTRATO DE ASAS DE *BOMBYX MORI* JÁ DESCRITAS COMO ALÉRGENOS

Massa molecular (kDa)	Nome da proteína	Referência
80	Não identificada	-
66	Transferrina	Binder <i>et al.</i> , 2001
50	Proteína heat shock	Liu <i>et al.</i> , 2009
45	Cadeia leve da vitelogenina	Yano <i>et al.</i> , 2004
37	Tropomiosina	Jeong <i>et al.</i> , 2017
30	Lipoproteína	Zuo <i>et al.</i> , 2015

FONTE: O Autor (2018)

5 DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo a destacar as principais proteínas alergênicas da mariposa Bm em indivíduos com alergia respiratória a partir de extrato alergênico preparado com asas desta espécie de inseto.

Mais de 300 proteínas já foram identificadas nos fluidos emanados durante o processo de metamorfose da mariposa do bicho-da-seda Bm. Estão envolvidas na síntese e degradação da cutícula, que é uma estrutura produzida a partir da secreção de proteínas, lipídeos e quitina pela epiderme destes insetos e se modifica durante a muda da mariposa (LIU., *et al*, 2018). Entretanto, poucas dessas foram identificadas como alérgenos específicos presentes na espécie Bm. As proteínas já descritas foram extraídas a partir da larva e da pupa da Bm (LIU., *et al*, 2008; JEONG., *et al*, 2016; WANG., *et al*, 2016), nenhuma relacionada à mariposa adulta, que foi o objetivo deste estudo.

Durante a padronização dos imunoensaios, foi feita comparação entre anticorpos secundários anti-IgE e anti-IgG. A positividade encontrada mesmo nos negativos do anticorpo anti-IgG pode refletir reação tardia após contato com a mariposa ou apenas sensibilidade sem repercussão clínica e possivelmente muitas ligações inespecíficas. Na reação em que se usou anticorpo anti-IgE, observou-se várias bandas no eluído da purificação e no extrato total de mariposa apenas nos participantes do grupo 1, o que provavelmente demonstra resposta IgE mediada e que podem ter sintomas imediatos após o contato com alérgenos de Bm (YUNGINGER., *et al*, 2000).

Os imunoensaios realizados com soros de indivíduos sensibilizados à Bm (grupo 1) e extrato alergênico produzido a partir das asas deste inseto revelaram a presença de 6 proteínas potencialmente alergênicas consideradas como principais ou *major*, definidas desta forma por Canonica e cols (2013), como aquelas encontradas em mais da metade dos indivíduos testados.

Houve tentativa de identificá-las por meio de espectrometria de massas, no entanto, foram identificadas duas proteínas, cujo número de peptídeos foi considerado muito baixo. Uma delas apresentou-se em quantidade significativamente superior no grupo estudo em relação ao grupo controle negativo: a vitelogenina. Várias outras proteínas foram identificadas pelo Wb e provavelmente as mesmas estejam diluídas

no extrato total de Bm, não tendo sido detectadas pelo espectrômetro de massas nas condições testadas.

Vitelina é a proteína mais abundante em ovos de insetos e o seu precursor, a vitelogenina é importante durante o ciclo reprodutivo de várias espécies de insetos. Como a Bm é uma espécie de mariposa do bicho-da-seda domesticada, tem sido utilizada como um modelo de organismo dos lepidópteros e sabe-se que essa proteína transportadora de lipídeos é uma das principais, embora não se saiba o seu potencial alergênico. Após purificação da vitelogenina, procedimento obrigatório para avaliação de suas funções, foram encontradas 3 bandas nas alturas de 46, 180 e 200 kDa. A primeira corresponde à cadeia leve e as 2 últimas às cadeias pesadas (YANO., *et al*, 1994). No presente estudo, foi encontrada uma banda na altura aproximada de 45 kDa em mais de 80% dos indivíduos sensíveis à mariposa. Devido à proximidade entre 45 e 46 kDa, inferiu-se que podem se tratar da mesma proteína. Sendo que não houve reatividade a essa proteína no grupo dos participantes sensíveis ao ácaro, podendo ser exclusiva da mariposa.

Na tentativa de refinar os resultados obtidos pela espectrometria de massas, foi feita uma cromatografia por imunoafinidade, com o objetivo de concentrar as proteínas no extrato de Bm. Todas as proteínas encontradas após eletroforese também estão presentes no Wb realizado com os soros dos participantes do grupo 1, cujos TCA foram positivos para mariposa. Portanto espera-se que ao realizar a análise deste material por espectrometria de massas, sejam identificadas as principais proteínas envolvidas na sensibilização alérgica destes participantes. Estas amostras ainda não foram enviadas, pois se dispendeu muito tempo para padronizar cada etapa da cromatografia e dos ensaios de Wb. As alíquotas purificadas estão armazenadas a -20°C e serão posteriormente analisadas. Outra limitação desse estudo foi o número de participantes incluído, que foi baseado em estudos semelhantes de identificação de alérgenos (LIU., *et al*, 2008; JEONG., *et al*, 2016), mas foi pequeno em termos estatísticos, pois houve dificuldade técnica em realizar maior quantidade de imunoensaios.

Como ainda não foram obtidos esses resultados por espectrometria de massas, a discussão será baseada nas prováveis proteínas encontradas com base nas massas moleculares, comparando-as a outras já descritas em bases de dados NCBI e PBD.

Para afirmar que uma proteína é um verdadeiro alérgeno, deve-se identificá-la por espectrometria de massas, desenvolver um recombinante e realizar imunoenaios, que devem ser positivos com a mesma (KING *et al.*, 1994). Mas com base nos testes realizados no estudo, verificou-se que a proteína localizada na altura de 80 kDa esteve presente em todos os indivíduos reatores sensibilizados à Bm, não sendo visualizada nos sujeitos sensíveis ao ácaro da poeira, tampouco nos controles negativos. Sendo portanto, um provável alérgeno específico da mariposa.

Foi relatado o caso de trabalhadora de uma fazenda, diagnosticada com asma e rinite alérgica, onde havia infestação de grilos. Constatou-se reatividade cutânea a 3 espécies desse inseto, assim como positividade de teste de provocação brônquica com extrato feito a partir dos mesmos. *Immunoblot* revelou a presença das seguintes bandas: 107, 80, 58 e 52 kDa (LINARES; HERNANDEZ; BARTOLOME, 2008). Assim como a proteína encontrada no presente estudo na altura de 50 kDa pode ser correspondente à de 52 kDa nesse caso, pois como já mencionado, há dificuldade em se identificar com precisão a altura das bandas. Algumas proteínas são altamente conservadas entre os insetos (SUN *et al.*, 2014), portanto a proteína de massa molecular de 80 kDa pode ser comum a diversas espécies, como mariposas e grilos, o que pode gerar reatividade cruzada entre elas. Essa proteína foi encontrada em todos os indivíduos reativos do grupo 1 e em nenhum dos sensíveis ao ácaro da poeira, sendo portanto uma proteína importante na sensibilização pela mariposa e provavelmente exclusiva deste inseto. Deve ser motivo de estudos futuros no esforço de identificá-la.

Bomb m 1 foi o primeiro componente alergênico identificado a partir da larva da mariposa do bicho-da-seda Bm (LIU *et al.*, 2009). No presente estudo, a arginina-quinase, cuja massa molecular é em torno de 40 kDa, foi encontrada em cerca de 1/3 dos participantes, não sendo considerada um alérgeno principal. O que pode ser explicado por conta das diferenças populacionais testadas, assim como a fonte e maneira de preparo dos extratos crus de Bm. No estudo chinês foram selecionados indivíduos com alergia ocupacional, enquanto neste, a sensibilização foi provavelmente em ambiente doméstico; além disso os extratos foram preparados respectivamente a partir da larva e das asas da mariposa adulta.

Por outro lado, neste mesmo estudo de Liu e cols, 2009 a análise por Wb dos soros de todos os indivíduos sensibilizados por meio de TCA com extrato confeccionado a partir da larva de Bm reagiram positivamente à banda de 50 kDa,

correspondente a proteína heat shock. Também encontrada na maioria dos participantes do presente estudo.

Outro estudo realizado nesse mesmo país identificou 6 proteínas alergênicas contidas na pupa da Bm, a partir de *pool* de soros de indivíduos sensibilizados à Bm. Uma delas, a thiol peroxiredoxina (22 kDa), foi capaz de induzir sintomas de asma em um modelo murino. Das 5 demais proteínas encontradas, quatro foram caracterizadas: heat shock (~ 20 kDa), proteínas da cutícula (~ 18 e 21 kDa) e quimiosensorial (~ 14 kDa) (WANG., 2016). Nenhuma das quais coincidiu com as proteínas encontradas no presente estudo, possivelmente por se tratarem de ensaios a partir de extratos de pupa e não da mariposa adulta.

Foram ainda identificados dois alérgenos de Bm a partir de extrato feito com a pupa em *pool* de soro de quatro participantes com histórico de reação alérgica alimentar após a sua ingestão, rotina tradicional em países asiáticos. Nesse estudo chinês, foram encontradas as proteínas quitinase (~60 kDa) e paramiosina (~ 100 kDa), que em comparação com ácaro da poeira (componente Der p 11), apresentaram similaridade no sequenciamento de aminoácidos de 90% (ZHAO., *et al*, 2015). No presente estudo, foram encontradas proteínas reagentes a essas mesmas alturas de bandas em aproximadamente 16% e 32% respectivamente. Embora não tenham sido proteínas *major*, podem ter potencial alergênico para alguns indivíduos predispostos. À medida que as proteínas sejam identificadas por espectrometria de massas, será possível fazer análise comparativa com outros insetos e aracnídeos, em busca de reatividade cruzada.

A espécie de mariposa *Plodia interpunctella*, considerada uma praga de alimentos em países europeus e no Estados Unidos da América, tanto em ambientes domésticos quanto em locais de armazenamento de alimentos como grãos e castanhas foi estudada. Verificou-se a sua importância como sensibilizante em 51% de 102 participantes com história de alergia respiratória por meio de IgE específica no soro. E a partir da amostra de um deles, foi possível identificar a proteína arginina-quinase, nomeada de Plo i 1, que apresentou reatividade cruzada com ácaros, baratas e camarão. Foi descrita também reatividade a um componente correspondente à banda de 66 kDa, correspondente à transferrina, proteína envolvida no metabolismo de ferro de diversos insetos (BINDER., *et al*, 2001, YANO., *et al*, 1994). No presente estudo, a grande maioria dos indivíduos sensíveis à Bm (aproximadamente 90%) e a totalidade dos sensibilizados a ácaro da poeira apresentaram reatividade por Wb na

altura de 66 kDa. Sendo portanto, possivelmente um componente de reação cruzada entre os mesmos.

Outro componente alergênico descrito a partir da pupa do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) em indivíduos com asma ocupacional foi Bom m 9 correspondente à altura de 30 kDa, uma lipoproteína (ZUO., *et al*, 2015) presente na hemolinfa, que é o líquido circulatório de vários invertebrados. Encontrado também nesta mesma altura de banda na maioria (aproximadamente 70%) dos participantes sensíveis à mariposa do presente estudo. Algumas proteínas podem ser conservadas durante o processo de metamorfose da Bm, estando presentes desde a fase larvar até a mariposa adulta (KANGO-SINGH; SINGH; GOPINATHAN, 2001). Desta forma, podem ser a mesma proteína.

Neste mesmo estudo de Zuo e cols (2015), imunoensaio realizado com soro de 24 sujeitos alérgicos demonstrou reatividade em 100% dos casos a bandas nas alturas de 36, 38 e 68 kDa. O que contrasta com o presente estudo, provavelmente pelo fato de terem sido utilizados extratos de pupa de Bm para avaliação de reatividade cutânea e posterior imunoensaio nos soros dos participantes chineses, enquanto nos do estudo foi usado extrato de asas de Bm.

Baldo e Panzani em 1988, descreveram componente na altura de 37 kDa, potencialmente tropomiosina, por imunoensaios em vários insetos e artrópodes, incluindo traça, mariposa comum, barata e ácaro da poeira. Encontrada da mesma maneira em mais da metade dos sujeitos testados no presente estudo, sendo considerada um alérgeno principal.

Na Coreia, foi produzida tropomiosina recombinante de mariposa do bicho-da-seda e demonstrou-se que havia frequência de inibição de 53,3% entre indivíduos alérgicos à pupa da mariposa. É uma proteína que apresenta forte homologia com outras tropomiosinas de invertebrados incluindo moluscos e crustáceos, sendo importante causa de alergia alimentar (JEONG., *et al*, 2017). Nos participantes do presente estudo, foram avaliados os componentes alergênicos por meio de ImmunoCAP ISAC, sendo encontrado Der p 10, que é uma tropomiosina em aproximadamente 20% dos casos, todos estes apresentaram reatividade à altura de banda de 37 kDa. Deve-se considerar a possibilidade de reatividade cruzada, em se tratando de um panalérgeno.

Em *Immunoblot* realizado a partir do soro de um paciente que apresentou sintomas de alergia respiratória à espécie de lepidóptero *Galleria mellonella* (durante

pescaria em que foi usada a sua larva como isca), foram encontradas bandas nas alturas de 27, 40 e 45 kDa (ANTICO., *et al*, 2017). Todas identificadas no presente estudo, porém com destaque à de 45 kDa, visualizada em mais de 85% dos participantes. Como se sabe que há homologia proteica de mais de 90% entre os lepidópteros (mariposas, traças e borboletas), muitas também devem ser as proteínas alergênicas comuns entre eles.

Em estudo coreano, foi identificada a glicoproteína 27 kDa a partir da pupa do bicho-da-seda Bm, considerada alérgeno alimentar importante, já que é causa de anafilaxia após o seu consumo em países asiáticos (JEONG., *et al*, 2016). No estudo, somente 4 de 19 indivíduos por Wb apresentaram reatividade a esta altura de banda, provavelmente por se tratarem de diferentes vias de sensibilização e de desencadeamento de sintomas alérgicos, respectivamente alimentar e respiratória.

Verificou-se nesse estudo de Jeong e cols (2016), que a glicoproteína 27 kDa é termostável, apresentando maior reatividade à IgE após fervura. Enquanto mais de 90% das demais proteínas estudadas desnaturou após este processo. No presente estudo, as amostras de extrato de Bm foram fervidas antes de realizar o Wb, portanto provavelmente as proteínas que foram encontradas também são termoestáveis, ou resistentes ao calor. Essa é uma característica que confere à proteína maior alergenicidade, podendo gerar reações alérgicas mais graves e menor chance de tolerância a este alérgeno (CANONICA., *et al*, 2013).

Até o momento, não foi possível identificar precisamente todas as proteínas contidas no extrato total de Bm por espectrometria de massas. Porém, a partir do material que foi purificado por meio da cromatografia de imunoafinidade, tem-se a perspectiva de que em breve esses resultados estejam disponíveis. Possibilitando a continuidade desta pesquisa.

6 CONCLUSÃO

Por meio da IgEs contidas nos soros dos participantes e extrato preparado a partir das asas da mariposa Bm, verificou-se a reatividade de 6 proteínas alergênicas principais com massas moleculares de 80, 66, 50, 45, 37 e 30 kDa com base em Wb e cromatografia de imunoafinidade.

A maior parte dessas proteínas já foi descrita conforme pesquisa em bancos de dados. A única não identificada foi a proteína de 80 kDa, que esteve presente nos imunoensaios de todos os participantes reativos do grupo dos sensíveis à mariposa e não foi visualizada nos sensíveis ao ácaro da poeira. Portanto é uma proteína importante e específica das asas da Bm. Assim como a de 45 kDa, encontrada na maioria dos indivíduos sensibilizados à mariposa e da mesma maneira não visualizada nos sensíveis ao ácaro, essa sendo identificada por espectrometria de massas como vitelogenina.

Demonstrou-se que há proteínas reagentes comuns entre os indivíduos desses dois grupos, devendo essas serem motivo de mais estudos principalmente relacionados à reatividade cruzada.

REFERÊNCIAS

- ANTICO, A.; VEGRO, M.; RASIO, G.; PASINI, G.; CURIONI, A. Bee moth (*Galleria mellonella*) allergy. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v.119, p.566-8, 2017.
- ARAUJO, L.M.L.; ROSARIO FILHO, N.A. Alergia inalatória a insetos. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v.2, p.297-301, 2018.
- ARAUJO, L.M.L.; ROSARIO FILHO, N.A. Determinação de IgE a alérgenos alimentares por microarray (ImmunoCAP-ISAC) em pacientes com rinite alérgica. **Brazilian Journal of Allergy and Immunology**, v.1, p.219-22, 2013.
- ARAUJO, L.M.L.; ROSARIO, N.A.; MARI, A. Molecular-based diagnosis of respiratory allergic diseases in children from Curitiba, a city in Southern Brazil. **Allergologia et Immunophatologia**, v.44, p.18-22, 2016.
- ARAUJO, L.M.L.; ROSARIO FILHO, N.A.; RIEDI, A.C. Respiratory allergy to moth: the importance of sensitization to *Bombyx mori* in children with asthma and rhinitis. **Jornal de Pediatria**, v.90, p.176-81, 2014.
- ARIANO, R.; PANZANI, R.C. Arthropods and invertebrates allergy (with the exclusion of mites): the concept of panallergy. **Allergy**, v.56, p.1-22, 2001.
- ARRUDA, K.L.; VAILES, L.D.; FERRIANI, V.P.L.; SANTOS, A.B.R.; POMMÉS, A.; CHAPMAN, M.D. Cockroach allergens and asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.107, p.417-28, 2000.
- BALDO, B.A.; PANZANI, R.C. Detection of IgE antibodies to a wide range of insect species in subjects with suspected inhalant allergies to insects. **Internal Archives of Allergy and Applied Immunology**, v.85, p.278-87, 1988.
- BINDER, M.; MAHLER, V.; SPERR, W.; SCHOLLER, M.; PROZELL, S.; WIEDERMANN, G.; *et al.* Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the indianmeal moth, *Plodia interpunctella* a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen. **Journal of Immunology**, v.167, p.5470-7, 2001.
- BURBACH, G.J.; HEINZERLING, L.M.; EDENHARTER, G.; BACHERT, C.; BINDSLEV-JENSEN, C.; BONINI, S.; *et al.* Ga²len skin test study II: clinical relevance of inhalant allergen sensitization in Europe. **Allergy**, v.64, p.1507-15, 2009.
- BOUSQUET, J.; KHALTAEV, N.; CRUZ, A.A.; DENBURG, J.; FOKKENS, W.J.; TOGIAS, A.; *et al.* Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008 update. **Allergy**, v.63, p.8-160, 2008.
- BROZEK, J.L.; BOUSQUET, J.; AGACHE, I.; AGARVAL, A.; BACHERT, C.; BOSNIC-ANTICEVICH, S.; *et al.* Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines—2016 revision. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.140, p.950-8, 2016.

CANONICA, G.W.; ANSOTEGUI, I.J.; PAWANKAR, R.; SCHMIDT-GRENDELMEIER, P.; HAGE, M.V.; BAENA-CAGNANI, C.E.; *et al.* A WAO - ARIA - GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. **World Allergy Organization Journal**, v.6, p.6-17, 2013.

CORRADELO, E.F.A. In: **Bicho-da-seda e amoreira: da folha ao fio, a trama de um segredo milenar**. São Paulo: Cone, 1987.

DELA BIANCA, A.C.C.; WANDALSEN, G.F.; SOLÉ, D. Lactente sibilante: prevalência e fatores de risco. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v.33, p.43-50, 2010.

DUCHARM, F.M.; TSE, S.M.; CHAUHAN B. Diagnosis, management, and prognosis of preschool wheeze. **The Lancet**, v. 383, p.1593-604, 2014.

DUTRA, B.M.R.S.; ROSÁRIO, N.A.; ZAVADNIAK, A.F. Alérgenos inaláveis em Curitiba: uma revisão de sua relevância clínica. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, p. 189-95, 2001.

ESTEVES, P.C.; ROSÁRIO FILHO, N.A.; TRIPPIA, S.G.; CALEFFE, L.G. Sensibilização atópica em escolares e adultos de Curitiba, Paraná. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v.22, p.156-60, 1999.

FEINBERG, A.R.; FEINBERG, S.M.; BENAIM-PINTO, C. Asthma and rhinitis from insect allergens. **Journal of Allergy**, v.27, p.437-44, 1956.

FONSECA A.S., FONSECA T.C.. In: **Cultura da amoreira e criação do bicho-da-seda: Sericicultura**. São Paulo: Nobel, 1988.

GOWDA, G.; SHIVALINGAIAH, A.H.; VIJAYEENDRA, A.M.; SARKAR, N.; NAGARAJ, C.; MASTHI, N.R.R. Sensitization to silk allergen among workers of silk filatures in India: a comparative study. **Asia Pacific Allergy**, v.6, p.90-3, 2016.

HARINDRANATH, N.; PRAKASH, O.M.; SUBBA RAO, P.V. Prevalence of occupational asthma in silk filatures. **Annals of Allergy**, v.55, p.511-5, 1985.

HARWANEGG, C.; HILLER, R. Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development. **Clinical and Chemical Laboratory Medicine**, v.43, p.1321-6, 2005

HOFFMANN, H.J.; VALOVIRTA, E.; PFAAR, O.; MOINGEON, P.; SCHMIDT, J.M.; SKAARUP, S.H.; *et al.* Novel approaches and perspectives in allergen immunotherapy. **Allergy**, v.72, p.1022-34, 2017.

JEONG, K.Y.; HAN, I.S.; LEE, J.Y.; PARK, K.H.; LEE, J.Y.; PARK, J.W. Role of tropomyosin in silkworm allergy. **Molecular Medicine reports**, v.15, p.3264-70, 2017.

JEONG, K.Y.; SON, M.; LEE, J.Y.; PARK, K.H.; LEE, J.H.; PARK, J.W. Allergenic Characterization of 27-kDa Glycoprotein, a Novel Heat Stable Allergen, from the Pupa of Silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Korean Medical Science**, v.32, p.18-24, 2016.

JOHANSSON, S.G.O. ImmunoCAP® Specific IgE test: an objective tool for research and routine allergy diagnosis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v.4, p.273-9, 2004.

KING, T.P.; HOFFMAN, L.; LOWENSTEIN, H.; MARSH, D.G.; PLATTS-MILLS, T.A.E.; THOMAS, W. Allergen nomenclature. **Internal Archives of Allergy and Applied Immunology**, v.105, p.224-33, 1994.

KANGO-SINGH, M.; SINGH, A.; GOPINATHAN, K.P. The wings of *Bombyx mori* develop from larval discs exhibiting an early differentiated state: a preliminary report. **Journal of Biosciences**, v. 26, p.167-77, 2001.

KINO, T.; OSHIMA, S. Allergy to insects in Japan I. The reaginic sensitivity to moth and butterfly in patients with bronchial asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.61, p.10-6, 1978.

KINO, T.; OSHIMA, S. Allergy to insects in Japan II. The reaginic sensitivity to silkworm in patients with bronchial asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.64, p.131-8, 1979.

KINO, T.; CHIHARA, J.; FUKUDA, K.; SASAKI, Y.; SHOGAKI, Y.; OSHIMA, S. Allergy to insects in Japan III. High frequency of IgE antibody responses to insects (moth, butterfly, caddis fly, and chironomid) in patients with bronchial asthma immunochemical quantitation of the insect related airborne particles smaller than 10 µm in diameter. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.79, p.857-66, 1987.

KHURANA, T.; BRIDGEWATER, J.L.; RABIN, R.L. Allergenic extracts to diagnose and treat sensitivity to insect venoms and inhaled allergens. **Annals of Allergy Asthma and Immunology**, v.118, p.532-6, 2017.

JEONG, K.Y.; HAN, I.S.; LEE, J.Y.; PARK, K.H.; LEE, J.H.; PARK, J.W. Role of tropomyosin in silkworm allergy. **Molecular Medicine Reports**, v.15, p.3264-70, 2017.

LAEMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-5, 1970.

LIERL, M.B.; RIORDAN, M.M.; FISCHER, T.J. Prevalence of insect allergen-specific IgE in allergic asthmatic children in Cincinnati, Ohio. **Annals of Allergy**, v.72, p.45-50, 1994.

LINARES, T.; HERNANDEZ, D.; BARTOLOME, B. Occupational rhinitis and asthma due to crickets. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v.100, p.566-9, 2008.

LIU, Z.; XIA, L.; WU, Y.; XIA, Q.; XEN, J.; ROUX, K.H. Identification and characterization of an arginin kinase as a major allergen from silkworm (*Bombyx mori*) larvae. **Internal Archives of Allergy and Clinical Immunology**, v.150, p.8-14, 2009.

LIU, H.W.; WANG, L.L.; TANG, X.; DONG, Z.M.; GUO, P.C.; ZHAO, D.C.; *et al.* Proteomic analysis of *Bombyx mori* molting fluid: Insights into the molting process. **Journal of Proteomics**, v. 173, p.115-25, 2018.

MENDES, E.; LACAZ, C.S. Alergia a insetos. In: **Alergia nas regiões tropicais**. São Paulo: Editora Universidade de São Paulo, p.89, 1965.

MITA, K.; KASAHARA, M.; SASAKI, S.; NAGAYASU, Y.; YAMADA, T.; KANAMORI, H.; *et al.* The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. **DNA Research**, v.11, p.27-35, 2004.

NELSON, H.S. In vivo testing for immunoglobulin E-mediated sensitivity. In: LEUNG, D.Y.M., SAMPSON, H.A.; GEHA, R.; SZEFLER, S.J. **Pediatric Allergy- Principles and Practice**. 2ªed. Oxford: Elsevier, p.250-8, 2011.

NAEPP – National Asthma Education and Prevention Program Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma, 2007, p.9-10.

OKINO, I. **Manual da Sericicultura**. Bauru: Abraseda, 1982, p.102-10.

OKUDA, M.; USAMI, A.; ITOH, H.; OGINO, S. Nationwide investigation of insect allergy in patients with allergic rhinitis. **Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho**, v.105, p.1181-8, 2002.

PATTERSON, R.; GRAMMER, L.C.; GREENBERGER, P.A. In: **Allergic Disease, Diagnosis and Management**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997.

POMÈS, A. Cockroach and Other Insect Allergens. **Clinical Allergy and Immunology**, v.21, p.182-200, 2008.

RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, C.E.; SOSSA-BRICEÑO, M.P.; CASTRO RODRIGUEZ, J.A. Factors predicting persistence of early wheezing through childhood and adolescence: a systematic review of the literature. **Journal of Asthma and Allergy**, v.10, p.83-98, 2017.

ROSÁRIO, N.A.; VILELA, M.M.S. Quantitative skin prick tests and serum IgE antibodies in atopic asthmatics. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v.7, p.40-5, 1997.

SAKANO, E.; SARINHO, E.S.C.; CRUZ, A.A.; PASTORINO, A.C.; TAMASHIRO, E.; KUSCHNIR, F.; *et al.* IV Brazilian Consensus on Rhinitis – an update on allergic rhinitis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.84, p.3-14, 2018.

SUN, B.; ZHENG, P.; WEI, N.; HUANG, H.; ZENG, G. Co-Sensitization to Silkworm Moth (*Bombyx mori*) and 9 Inhalant Allergens among Allergic Patients in Guangzhou, Southern China. **Plos one**, v.9, e.94476, 2014.

URAGODA, C.G.; WIJAKOON, P. Asthma in silk workers. **Journal of Social and Occupational Medicine**, v.41, p.140-2, 1991.

WANG, H.; HU, W.; LIANG, Z.; ZENG, L.; LI, J.; YAN, H.; *et al.* Thiol peroxiredoxin, a novel allergen from *Bombyx mori*, modulates functions of macrophages and dendritic cells. **American Journal of Translational Research**, v.8, p.5320-9, 2016.

WANG, X., ZHENG S., ZHANG H. A study of occupational asthma and specific IgE in sericulture workers. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao**, v.16, p.323-327, 1994.

WYNN, S.R.; SWANSON, M.C.; REED, C.E.; PENNY, N.D.; SHOWERS, W.B.; SMITH, J.M. Immunochemical quantitation, size distribution, and cross-reactivity of lepidoptera (moth) aeroallergens in southeastern Minnesota. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.82, p.47-54, 1988.

YOSHIDA, M.S. **Sirgaria e depósito de folhas. Boletim da Fiação de Seda.** Duartina: Bratac, 1994.

YANO, K.I.; SAKURAI, M.T.; WATABE, S.; IZUMI, S.; TOMINO, S. Structure and expression of mRNA for vitellogenin in *Bombyx mori*. **Biochemical et Biophysics Acta**, v.1218, p.1-10, 1994.

YUNGINGER, J.W.; AHLSTEDT, S.; EGGLESTON, P.A.; HOMBURGER, H.A.; NELSON, H.S.; OWNBY, D.R.; PLATTS-MILLS, T.A.E.; SAMPSON, H.A.; SICHERER, S.H.; WEINSTEIN, A.M.; WILLIAMS, P.B.; WOOD, R.A.; ZEIGER, R.S. Quantitative IgE antibody assays in allergic diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.105, p.1077-84, 2000.

ZHAO, X.; LI, L.; KUANG, Z.; LUO, G.; LI, B. Proteomic and immunological identification of two new allergens from silkworm (*Bombyx mori* L.) pupae. **Experimental Immunology**, v.40, p.30-4, 2015.

ZHONG, B.X. Protein databank for several tissues derived from five instar of silkworm. **Yi Chuan Xue Bao**, v.28(3), p.217-24, 2001.

ZUO, J.; LEI, M.; YANG, R.; LIU, Z. Bom m 9 from *Bombyx mori* is a novel protein related to asthma. **Microbiology and Immunology**, v.59, p.410-8, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Versão 2 – 24 de fevereiro de 2014

Título do Estudo: Alergia respiratória à mariposa do bicho-da-seda (*Bombyx mori*): identificação das principais proteínas alergênicas por meio de *Immunoblot*.

Pesquisador: Dra. Laura Maria Lacerda Araujo

Responsável: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Rua General Carneiro, nº 181

Curitiba – PR

CEP 80060-900

Tel.: (41) 3208-6502

Orientador: Dr. Nelson Augusto Rosário Filho

Pode ser que este documento denominado termo de consentimento livre e esclarecido contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao médico ou à equipe do estudo para lhe explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

INTRODUÇÃO

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa médica que prevê inclusão de crianças e/ou adolescentes. Antes de consentir a sua participação, solicitamos que você leia ou peça a alguém que leia para você as informações contidas neste termo de consentimento.

Esta pesquisa tem o objetivo de avaliar o desenvolvimento de alergia à mariposa em pessoas com diagnóstico de doenças respiratórias alérgicas.

O aparecimento de doenças alérgicas é resultado de uma complexa interação entre a hereditariedade do indivíduo e as condições ambientais, que podem determinar sensibilização.

A denominação atopia ou alergia refere-se a uma tendência pessoal e familiar de produzir anticorpos em resposta a estímulos como poeira, mofo, leite de vaca, pelos de animais e outros. Os alérgicos tem sintomas de bronquite (chiado no peito e tosse), rinite (nariz trancado, espirros e coceira no nariz), conjuntivite (olhos vermelhos e coceira nos olhos). O conhecimento sobre os fatores desencadeantes dessas doenças é importante para a implementação de controle ambiental ao tratamento já utilizado, melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

A mariposa é um inseto muito comum em nosso meio e a investigação sobre sua relevância clínica como causadora das doenças acima citadas é interessante para instituir medidas de controle, que auxiliem no tratamento e nas consequências das doenças respiratórias alérgicas.

Se após a leitura deste termo, você decidir que concorda com a sua participação neste estudo, será pedido que você assine e date este documento para confirmar que você recebeu todas as informações necessárias e pertinentes sobre o estudo e permitiu voluntariamente a sua participação. Você receberá uma via assinada e datada pela pessoa que lhe explicou este documento.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo é determinar os principais proteínas envolvidas no desenvolvimento de alergia respiratória à mariposa. Serão realizados testes cutâneos alérgicos e coleta de sangue por punção venosa nestes pacientes.

INFORMAÇÕES GERAIS

Este estudo contará com a participação de crianças e/ou adolescentes e será realizado no Serviço de Alergia, Imunologia e Pneumologia Pediátrica da Universidade Federal do Paraná, com o intuito de fornecer dados para a tese de doutorado da pesquisadora responsável pelo estudo.

PROCEDIMENTOS A SEREM SEGUIDOS DURANTE O ESTUDO

Se você concordar com a sua participação na pesquisa, assinando este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, a médica responsável poderá utilizar-se dos dados coletados.

Será feito teste cutâneo alérgico, denominado de *prick test*, que consiste no contato de uma gota de alérgenos de mariposa sobre a sua pele, realizando em seguida uma discreta picada na pele e aguardando-se 15 minutos para leitura da reação. E posteriormente coleta de 5mL de sangue para avaliação laboratorial de alergia à mariposa. Para a retirada de sangue será feita uma punção com agulha na veia da dobra do antebraço, o que pode causar dor. O sangue será testado em laboratório para a presença de anticorpos contra a mariposa.

POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

Os riscos associados à pesquisa se restringem aos procedimentos a serem realizados no estudo, como à coleta de sangue, podendo haver mancha roxa, inchaço ou dor no local da retirada de sangue. O teste na pele causa pequeno desconforto pela punção e no caso de haver reação, coceira no local que desaparece em poucos minutos.

Você será informado caso algum novo risco ou desconforto seja identificado durante o estudo.

POSSÍVEIS BENEFÍCIOS

Não há garantias de benefícios possíveis devido à sua participação neste estudo. Entretanto, é garantido que você continue a receber acompanhamento médico periódico ambulatorial no Hospital de Clínicas. E a sua participação juntamente com outras crianças ou adolescentes contribuirá para reconhecer a presença e importância da sensibilização à mariposa nos pacientes com doenças alérgicas. Melhorando a forma de tratamento desses pacientes.

COMPENSAÇÃO POR PARTICIPAÇÃO E RESSARCIMENTO DE DESPESAS

Você não receberá pagamento pela sua participação neste estudo.

A consulta, os procedimentos e exames laboratoriais programados para o estudo serão realizados sem nenhum custo para você.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA E DESISTÊNCIA DO ESTUDO

A participação neste estudo é voluntária. Você pode desistir da sua participação no estudo a qualquer momento sem sofrer consequências ruins, ou perda de seus direitos. Se ocorrer a desistência da sua participação no estudo, os dados de pesquisa obtidos antes da decisão ainda poderão ser utilizados dentro dos limites permitidos, mas nenhum dado novo será coletado posteriormente.

O seu médico da pesquisa ou o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) podem determinar o término ou a interrupção da pesquisa a qualquer momento com ou sem seu consentimento. Neste caso, isto ocorrerá somente após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

Para perguntas relacionadas a esta pesquisa ou para relatar um problema de saúde relativo à pesquisa, você deve procurar:

Dr^a Laura Maria Lacerda Araujo
Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
Rua General Carneiro, nº 181
Curitiba – PR
CEP 80060-900
Tel.: (41) 3208-6502

Se você tiver dúvidas sobre os seus direitos como sujeito da pesquisa, você poderá procurar:

Prof. Dr. Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Tel.: (41) 3360-1041

ACESSO E USO DOS DADOS OBTIDOS DA PESQUISA E CONFIDENCIALIDADE

Uma lista contendo as suas informações de contato incluindo o nome completo, endereço e número de telefone será mantida pelo médico do estudo separadamente dos demais dados do estudo. Os dados do estudo serão registrados em uma Ficha Clínica, ou seja, um documento confeccionado exclusivamente para coleta dos dados obtidos pela sua participação no estudo.

Todas as informações que forem coletadas e os registros da participação do(a) seu(sua) filho(a) neste estudo serão mantidos sob sigilo e confidencialidade. Todas as legislações, resoluções e códigos de ética brasileiros serão cumpridos no decorrer deste estudo.

Seu médico do estudo solicita o seu consentimento, através deste documento, para que os seus registros médicos relacionados ao estudo possam ser revisados pela equipe de seu médico do estudo, bem como por membros das autoridades regulatórias do Brasil, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (caso seja necessário) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa responsável. O objetivo é assegurar que o estudo esteja sendo conduzido corretamente.

As informações obtidas serão combinadas com os resultados de outras crianças ou adolescentes que também participam do estudo. Estas informações serão utilizadas de maneira que não seja possível identificá-lo(a). Os registros capazes de identificá-los serão mantidos de maneira confidencial por seu médico conforme determinado por nossas leis e não serão colocados à disposição pública.

Os resultados do estudo poderão ser publicados ou utilizados também nos relatórios do estudo e apresentações científicas; entretanto a sua identidade não será revelada em nenhum momento.

Você tem o direito de verificar e fazer uma cópia do seu registro relacionado à pesquisa após a finalização da mesma. Você pode solicitar esses registros ao seu médico da pesquisa.

USOS POTENCIAIS DOS DADOS DO ESTUDO

Neste estudo, informações sobre a sua saúde pessoal serão coletadas a partir dos registros médicos e/ou relatórios de pesquisa. Serão utilizadas nos relatórios do estudo para tese de doutorado da pesquisadora responsável ou para apresentações e publicações científicas; tais relatórios e publicações nunca o(a) identificarão pelo nome.

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu li e entendi o conteúdo deste documento. Tive oportunidade de discutir o estudo com meu médico (ou alguém de sua equipe designado para este fim) e me sinto suficientemente familiarizado com o estudo para dar o consentimento voluntário da participação de meu (minha) filha (a) neste estudo. Eu recebi uma cópia deste consentimento e minhas dúvidas foram esclarecidas de maneira satisfatória e em linguagem que posso facilmente entender.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os exames realizados e possíveis desconfortos, assim também como as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação do meu (minha) filho (a) é voluntária, isenta de despesas e que a qualquer momento eu posso retirar o consentimento de participação no estudo sem prejuízos com relação ao acompanhamento médico a que ele (ela) tem direito.

Nome do sujeito de pesquisa

Assinatura do responsável pelo sujeito de pesquisa

Data

Nome da Pessoa Responsável pela explicação do documento

Assinatura da Pessoa Responsável pela explicação do documento

Data

APÊNDICE 2 – PROVÁVEIS PROTEÍNAS NOS PARTICIPANTES REATORES DO GRUPO 1

APÊNDICE 2 – PROVÁVEIS PROTEÍNAS POR WB NOS PARTICIPANTES REATORES DO GRUPO 1 (n=19)

MM (kDa)	1 A	2 A	3 A	4 A	5 A	6 A	7 A	8 A	9 A	10 A	11 A	12 A	13 A	14 A	15 A	17 A	19 A	21 A	22 A	TOTAL (%)
185					X															1 (5,3)
182	X				X									X						3 (15,8)
150					X					X				X						3 (15,8)
115	X	X		X					X	X				X						5 (26,3)
100	X	X			X				X	X				X						6 (31,6)
90									X	X										2 (10,5)
80	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	19 (100)
66	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	17 (89,5)
64					X											X				2 (10,5)
60		X	X	X																3 (15,8)
55		X	X	X	X				X	X				X		X				8 (42,1)
50	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X		X	X	16 (84,2)
45	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	16 (84,2)
40							X		X	X	X			X	X					6 (31,6)
37	X	X	X	X	X		X		X	X	X			X	X					11 (57,9)
35									X	X										2(10,5)
30	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X					13 (68,4)
27	X	X	X		X															4 (21,0)

FONTE: O Autor (2018)

APÊNDICE 3 – PROVÁVEIS PROTEÍNAS NOS PARTICIPANTES REATORES DO GRUPO 2

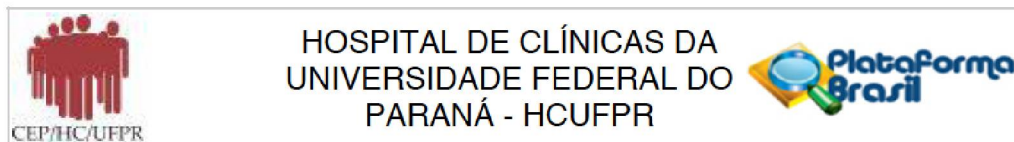
APÊNDICE 3 – PROVÁVEIS PROTEÍNAS POR WB NO PARTICIPANTES REATORES DO GRUPO 2 (n=7)

MM (kDa)	2C	3C	4C	5C	6C	7C	8C	TOTAL (%)
150							X	1 (14,3)
100							X	1 (14,3)
66	X	X	X	X	X	X	X	7 (100,0)
64		X			X	X	X	4 (57,1)
55							X	1 (14,3)
50	X	X	X	X	X	X	X	7 (100)
40	X	X	X	X	X	X	X	7 (100)
37	X	X				X	X	4 (57,1)
30	X	X					X	3 (42,8)
27	X	X					X	3 (42,8)

FONTE: O Autor (2018)

ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS – CHC-UFPR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da prevalência de reatividade cutânea ao extrato alergênico de mariposa e presença de IgE específica através do método ISAC em crianças com alergia respiratória.

Pesquisador: Laura Maria Lacerda Araujo

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 27605914.2.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 627.256

Data da Relatoria: 14/04/2014

Apresentação do Projeto:

Resumo:

Uma alta taxa de sensibilidade à mariposa foi detectada em pacientes com diagnóstico de asma, rinite e conjuntivite alérgicas através da positividade de teste cutâneo alérgico por puntura e da presença de IgE específica no soro. A sensibilização à mariposa é causada principalmente por alérgenos encontrados em suas asas, no entanto, partículas em suspensão no ar (escamas, secreções e resquícios de insetos desintegrados) têm sido implicadas como causa de alergia. Em 1997, ROSÁRIO, realizou testes cutâneos alérgicos em 250 crianças atópicas em acompanhamento no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e detectou que 96 (38,4%) apresentavam testes cutâneos alérgicos positivos a extrato de mariposa 1:20 peso/volume (*Heterocera* sp- Hollister-Stier/Bayer Corporation - Spokane, WA-USA). Essa foi a segunda causa, em frequência, de positividade aos testes cutâneos por puntura com alérgenos inaláveis. A principal foi *Dermatophagoides pteronyssinus* 5000AU (Hollister-Stier/Bayer Corporation-Spokane, WAUSA), correspondendo a aproximadamente 97,5% (754/772) de reatividade. O alto índice de sensibilização às mariposas merece melhor avaliação sobre sua relevância clínica e uma identificação mais minuciosa de seus alérgenos.

Estudo transversal com 100 crianças e adolescentes diagnosticados com asma e rinite alérgica.

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

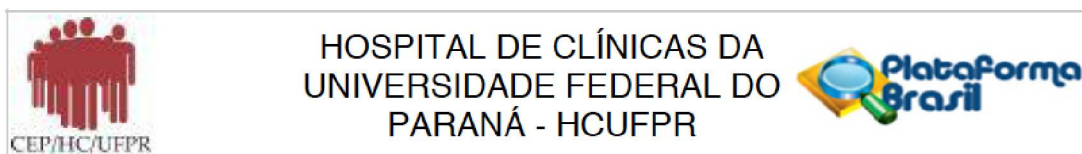
UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 627.256

Hipótese:

Espera-se encontrar alta taxa de sensibilidade à mariposa do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) em pacientes com alergia respiratória.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos deste projeto são: a) preparar o antígeno de *Bombyx mori* para a confecção de extrato alergênico em concentrações pré-determinadas e realização de prova imunológica; b) avaliar a prevalência da reatividade cutânea ao extrato alergênico de *Bombyx mori* através de testes cutâneos alérgicos em 100 crianças atópicas acompanhadas no Ambulatório de Alergia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná; c) identificar IgE específica para os principais alérgenos da *Bombyx mori* através do sistema ISAC (immuno solid-phase allergen chip) a partir do soro das crianças acima descritas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos associados à pesquisa se restringem aos procedimentos a serem realizados no estudo, como à coleta de sangue, podendo haver mancha roxa, inchaço ou dor no local da retirada de sangue. O teste na pele causa pequeno desconforto pela punção na pele e no caso de haver reação, coceira no local que desaparece em poucos minutos.

Benefícios:

Não há garantias de benefícios possíveis devido à participação neste estudo. A participação contribuirá para reconhecer a presença e importância da sensibilização à mariposa nos pacientes com doenças alérgicas. Melhorando a forma de tratamento desses pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa se apresenta estruturado e coerente em relação à ética na pesquisa envolvendo seres humanos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os Termos obrigatórios foram anexados. Pendências atendidas de forma adequada.

Recomendações:

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



HOSPITAL DE CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - HCUFPR



Continuação do Parecer: 627.256

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foram encaminhados os itens pendentes: Cv dos pesquisadores, cronograma, orçamento dos custos de envio de amostras para fora do país, ciência do laboratório quantos aos exames de rotina; hemograma, VHS, IgE e Termo de assentimento.

Projeto considerado aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa. O pesquisador deve manter os documentos arquivados sob sua responsabilidade, pelo prazo de cinco anos após o término da pesquisa.

CURITIBA, 27 de Abril de 2014

Assinador por:
Renato Tambara Filho
(Coordenador)

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br

ANEXO 2 – PRODUÇÃO ACADÊMICA



ARQUIVOS DE
ASMA, ALERGIA
E IMUNOLOGIA

© 2018 ASBAI

Artigo de Revisão

Alergia inalatória a insetos

Inhalant allergy to insects

Laura Maria Lacerda Araujo¹, Nelson Augusto Rosário-Filho¹

RESUMO

Asma e rinoconjuntivite alérgicas são doenças que apresentam alta prevalência mundial. Os aeroalérgenos estão entre os principais fatores desencadeantes de sintomas em indivíduos sensibilizados. Há centenas de alérgenos inalantes envolvidos neste processo; porém, os provenientes de insetos, embora frequentes, têm sido pouco valorizados na prática clínica. Esta revisão busca demonstrar, a partir de estudos relevantes, a importância deste tema.

Descritores: Alérgenos, insetos, asma, rinite alérgica.

ABSTRACT

Allergic asthma and rhinoconjunctivitis are highly prevalent diseases worldwide. Aeroallergens are among the major triggers of symptoms in sensitized individuals. There are hundreds of inhalant allergens involved in this process; however, the ones from insects, though frequent, have been underestimated in clinical practice. This review seeks to demonstrate, based on relevant studies, the importance of this subject.

Keywords: Allergens, insects, asthma, allergic rhinitis.

Introdução

Houve um aumento da incidência das doenças alérgicas respiratórias nas últimas décadas, sendo consideradas problemas de saúde pública¹. A sensibilização a alérgenos inaláveis é um fator de risco para o desenvolvimento de asma e rinite alérgica^{2,3}, portanto, o conhecimento a respeito dos aeroalérgenos é fundamental para o diagnóstico e tratamento destas doenças^{4,5}.

O papel dos insetos na produção de alérgenos inalantes e desencadeamento de sintomas respiratórios vem sendo discutido há décadas⁶. Mariposas, borboletas, mosquitos e baratas já foram descritos como sensibilizantes em ambientes externos, mas principalmente intradomiciliares⁷. A quantidade e variedade de espécies pode ter distribuição sazonal de acordo com o clima, ou ciclo reprodutivo de cada inseto⁸. A importância das diferentes espécies de in-

setos como fontes alergênicas conforme a localização geográfica não está bem definida. Estima-se que haja mais de 10 milhões de espécies de insetos, embora somente cerca de 750.000 tenham sido identificadas por entomologistas⁹. São capazes de explorar os ambientes terrestres, aéreos e aquáticos. O seu sucesso evolutivo se deve, em grande parte, ao fato de terem desenvolvido asas, o que os permitiu atingir novos habitats, tanto na procura por alimentos, como para fugir dos inimigos; além de produzirem um ovo revestido por material muito resistente, denominado cório¹⁰.

Resíduos que emanam dos insetos, como escamas, pelos, secreções e partes desintegradas do corpo podem estar contidos na poeira doméstica, desencadeando sintomas de asma e rinoconjuntivite alérgica em indivíduos sensibilizados⁶. Até o momento

1. Universidade Federal do Paraná, Pediatría - Curitiba, PR.

Submetido em: 22/06/2018, aceito em 30/06/2018.
Arq Asma Alerg Imunol. 2018;2(3):297-301.

<http://dx.doi.org/10.5935/2526-5393.20180038>

há pouca informação sobre incidência, natureza, reatividade clínica e cruzada entre alérgenos de insetos. Com o objetivo de valorizar a onipresença dos insetos nos mais diversos ambientes, inclusive domésticos, segue uma revisão sobre seus principais alérgenos inalantes e sua relação com as doenças alérgicas respiratórias.

Classificação dos insetos

Os insetos fazem parte dos artrópodes, o maior grupo animal existente na superfície terrestre. Ao longo do processo evolutivo, adquiriram enorme capacidade adaptativa, sobrevivendo em todos os habitats terrestres. A característica principal desses animais é a presença de um exoesqueleto. O grupo é formado por crustáceos, diplopodes e cheliceratos, estes últimos incluem as aranhas; mas são os insetos que se destacam com mais de 80% das espécies¹⁰.

Toda espécie de animal vivo é caracterizada por dois nomes latinos: o primeiro referente ao gênero, o segundo à espécie. Incluídos em grupos maiores de forma crescente por afinidades como segue: família, ordem, classe, filo e reino. A classe dos insetos (Hexapoda) contém 29 ordens, separadas conforme características físicas similares (quantidade de asas e outras), sendo as principais: Hemiptera (cigarras, percevejos), Orthoptera (grilos, gafanhotos), Coleoptera (besouros), Lepidoptera (borboletas, mariposas), Hymenoptera (abelhas, vespas, formigas), Diptera (moscas, mosquitos), entre outras⁹.

Alérgenos inalantes de insetos

Diversos componentes do corpo dos insetos podem ser alergênicos. Para que se tornem alérgenos inalantes, suas proteínas devem estar em suspensão no ar. Há três principais maneiras deste processo ocorrer. A primeira é por meio do corpo do inseto morto, que pelo fato de ser seco e leve, torna-se parte da poeira doméstica. A segunda forma se dá por destaque de pelos, escamas e exoesqueleto deixado por alguns insetos durante a metamorfose. Por fim, produtos de secreção metabólica, como as fezes, podem se tornar potenciais alérgenos. A dispersão destas partículas ocorre de forma ativa pela migração dos insetos para diversos ambientes, e de forma passiva, pelo ar.

Estudos utilizando diversos métodos de coleta em ambientes externos e domésticos identificaram

e encontraram altos níveis de alérgenos de baratas, moscas e borboletas em amostras de poeira⁹. Foram identificados alérgenos de quironomídeos (mosquitos da ordem Diptera) na hemoglobina destes insetos. Outros alérgenos de insetos (gafanhotos, grilos, abelhas, besouros e larvas de mosquitos) foram relacionados ao desenvolvimento de asma e rinoconjuntivite alérgica em ambientes ocupacionais¹¹. Em determinadas áreas geográficas, ocorrem alergias respiratórias sazonais a determinados insetos, como moscas e mosquitos. Recentemente foram identificados alérgenos de um pequeno besouro de origem asiática, chamado *Harmonia axyridis*, como desencadeantes de alergia respiratória sazonal na Europa e na América do Norte¹¹.

Seguem os principais insetos envolvidos na sensibilização alérgica a inalantes.

Barata

O primeiro relato de alergia respiratória à barata foi publicado há mais de 50 anos, e tem sido o inseto mais estudado desde então. Há em torno de 5.000 espécies de barata descritas, mas duas são responsáveis por induzir a maior parte dos casos de alergia: *Blattella germanica* e *Periplaneta americana*^{12,13}.

São fontes importantes de alérgenos intradomiciliares em áreas urbanas, principalmente em locais com baixo nível socioeconômico. Alérgenos de barata podem ser encontrados em todos os cômodos da casa, mas na cozinha os níveis são mais elevados, indicando infestação. No entanto, os que estão localizados nos quartos são responsáveis pela sensibilização¹³. Secreções corporais e invólucros de ovos das baratas secam, tornando-se componentes da poeira doméstica, que podem permanecer no ambiente por meses, mesmo após a remoção destes insetos.

Já foram descritos mais de 10 grupos de alérgenos de barata, e novos estão em processo de identificação¹⁴. Os mais estudados têm sido Bla g 1, Bla g 2, Bla g 4, Blag 5, Bla g 6 (*Blattella germanica*) e Per a 1, Per a 3, Per a 7 (*Periplaneta americana*). Caracterizadas como protease aspártica, calcina, troponina, tropomiosina, arilophorina e glutathione-S-transferase; são encontradas na saliva, intestino, corpo, fezes e remanescentes do exoesqueleto das baratas. Até o momento, sabe-se que os alérgenos mais envolvidos do processo de hipersensibilidade são Bla g 1, Bla g 2 e Per a 19, sendo que os alérgenos do grupo 1 (Bla g 1 e Per a 1) apresentam reatividade cruzada¹⁵.

Estudo brasileiro em que foram realizados testes cutâneos alérgicos em 994 adolescentes demonstrou positividade de 15,8% para *Periplaneta americana*, e 13,4% para *Blattella germanica*. Deste total, 470 indivíduos tinham diagnóstico de asma e/ou rinite, e nestes, as taxas de testes positivos para os mesmos alérgenos foram maiores: 20% e 17,2%, respectivamente¹⁸. Em outro estudo, 101 crianças e adolescentes que apresentavam doença alérgica respiratória foram submetidos a teste molecular para detecção de componentes alergênicos (103 no total). Encontrou-se positividade de 0,9% para Bla g 1 e Bla g 5, e 16,8% para Bla g 7, sendo que os dois primeiros indicam sensibilidade genuína à barata, e o último indica componente de reação cruzada com outros alérgenos de ácaro, helminto e camarão¹⁷.

Está bem estabelecido que exposição a alérgenos de barata (Bla g 1 e Bla g 2) na infância precoce está fortemente associada não somente a aumento da sensibilização, mas também pode contribuir para o desenvolvimento de asma nestas crianças. E nos pacientes que já têm diagnóstico, pode elevar as taxas de admissão hospitalar e outros parâmetros de morbidade relacionada à asma⁶.

Mosquito

Há descrições sobre asma e rinite desencadeadas por espécies de moscas e mosquitos como *may fly* e *caddis fly* publicadas desde a década de 1950¹⁸. Detritos emanados a partir de mosquitos podem ser liberados no ar e se tornar potentes alérgenos inalantes, causando doenças respiratórias IgE mediadas. Há três espécies de mosquitos que são comuns e podem estar envolvidas neste processo: *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi*. Na Índia, foi descrita pela primeira vez a presença de alérgenos de mosquitos em pequenas partículas no ar, e que estas poderiam ser inaladas e provocar sintomas relacionados a asma e rinite alérgica¹⁹.

Neste mesmo estudo, realizado em indivíduos sensibilizados ao mosquito *Culex quinquefasciatus* (por teste cutâneo alérgico com extrato confeccionado a partir do corpo deste inseto e IgE específica sérica), evidenciou-se por imunoenaios que há homologia proteica entre as três espécies supracitadas de mosquito. Os mesmos 26 indivíduos foram submetidos a teste cutâneo alérgico para as espécies *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi*, e 73% apresentaram positividade aos três, demonstrando que há reatividade cruzada entre eles¹⁹. Foram identificados alérgenos

a partir da saliva e corpo destas três espécies de mosquitos: *Aedes aegypti* (Aed a 1 - 11), *Anopheles gambia* (Ano g 7), e *Culex quinquefasciatus* (Cul q 4 - 8), porém, as proteínas estudadas são relacionadas a reações na pele após a picada destes insetos^{8,14}.

Aproximadamente 30% de alérgicos ao ácaro da poeira doméstica na Holanda apresentaram anticorpos IgE contra traça, barata e/ou mosquito (família Chironomidae). Nos pacientes alérgicos cuja IgE específica foi negativa para *Dermatophagoides pteronyssinus*, menos de 5% reagiram aos três insetos, demonstrando que há reatividade cruzada entre eles²⁰.

Estudo realizado com asmáticos na cidade de São Paulo mostrou positividade ao teste cutâneo alérgico (TCA) com extrato de mosquitos em 32,5%²¹, e no Japão, encontrou-se frequência de 19,4% de positividade a mosquito por IgE específica no soro de indivíduos portadores de rinite alérgica²². Sugere-se que alérgenos de mosquito sejam mais valorizados, não somente como desencadeantes de reações cutâneas, mas também de sintomas respiratórios.

Mariposa

A espécie de mariposa mais estudada é a do bicho-da-seda *Bombyx mori*, cuja importância foi inicialmente comprovada em trabalhadores da indústria da seda, que apresentavam alergia ocupacional. Durante a criação do bicho-da-seda, os trabalhadores estão expostos diretamente aos seus antígenos inaláveis, presentes desde a seleção até a eclosão dos casulos, quando há contato com poeira das asas das mariposas²³. Estes alérgenos podem desencadear sintomas de asma e rinoconjuntivite²⁴⁻²⁶.

Em estudo chinês, verificou-se que 68 de 90 sericultores apresentavam sintomas de alergia respiratória, e 14 tinham diagnóstico de asma ocupacional. Os alérgenos relacionados foram provenientes de casulos e urina do bicho-da-seda, e excreções e escamas das asas das mariposas⁷. A mariposa do bicho-da-seda tem reatividade cruzada com outras espécies de mariposas e borboletas, e foi comprovado que pacientes com doenças alérgicas respiratórias podem também desenvolver sintomas a partir da exposição ambiental aos seus alérgenos, não somente após contato com antígenos no local de trabalho^{28,29}.

Com o objetivo de verificar as concentrações de antígenos de mariposa na cidade de Minnesota, Winn e cols. analisaram amostras de poeira em ambiente externo (não domiciliar) durante um período

de 3 anos. Verificou-se por meio radioimunoensaio níveis comparáveis aos de alérgenos de polens, e encontrou-se índices mais altos em determinados meses do ano. Os autores concluem que a mariposa representa importante alérgeno sazonal nos Estados Unidos da América.

Neste mesmo estudo, foram realizados testes cutâneos com extratos de mariposa em 257 pacientes sensibilizados a aeroalérgenos comuns, e houve 45% de reatividade nesta população³⁰. Na China, 40% de 175 pacientes com alergia respiratória eram sensibilizados à mariposa do bicho-da-seda. Praticamente metade destes, também era sensível a pelo menos 1 de 9 outros alérgenos inalantes testados por meio de IgE específica sérica³¹. Estudo brasileiro realizado em crianças e adolescentes com diagnóstico de asma e/ou rinite alérgica indicou por meio de testes cutâneos alérgicos e IgE específica sérica que *Bombyx mori* foi o segundo alérgeno sensibilizante mais frequente, após ácaros da poeira³².

São descritos dois alérgenos principais da mariposa do bicho-da-seda: Bomb m 1, relacionado principalmente à alergia alimentar, em locais onde se consome a pupa da mariposa¹⁴; e Bomb m 7, tropomiosina considerada panalérgeno, capaz de apresentar ampla reatividade cruzada com componentes de outros insetos, como Der p 10 (proveniente do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*), e Bla g 7 (proveniente da barata *Blattella germanica*)^{33,34}.

Insetos como panalérgenos

Desde o século passado, vários estudos vêm demonstrando reatividade cruzada entre antígenos de insetos. Em 1958, encontrou-se por método de inibição de hemaglutinação, um antígeno em comum entre a espécie de mosca *Phormia regina* e baratas³⁵. Anos após, usando a mesma técnica, foi demonstrado que havia antígeno comum entre espécies de borboleta, mariposa, gafanhoto e mosquito³⁶. Outro estudo francês verificou que 30% de pacientes com alergia respiratória a determinado inseto doméstico apresentavam testes cutâneos e IgE específica sérica (RAST) a outros insetos e artrópodes, entre eles: baratas, besouros, moscas, mosquitos, mariposas, traças e gafanhotos. Os autores comentam que um indivíduo pode se expor a um enorme repertório de insetos nos mais diversos lugares, e é difícil determinar se ele tem múltiplas sensibilizações por conta de múltiplas exposições a insetos, ou se há significativa reatividade cruzada entre eles. Há ainda a possibilidade de ambos

os mecanismos poderem estar presentes no mesmo indivíduo, mas sugere-se que deva haver um antígeno sensibilizante primário, e posterior reação cruzada entre alérgenos de diferentes espécies²⁰.

A partir da introdução de técnicas de biologia molecular, foi possível definir melhor os epítopos alérgênicos e identificar se há sensibilidade genuína a determinado alérgeno, ou presença de reatividade cruzada³⁸⁻³⁹. A tropomiosina é um dos principais panalérgenos, presente em insetos e artrópodes, mas também em outros invertebrados, como ácaros, moluscos, crustáceos e nematódeos. Já foi verificada reatividade cruzada entre estes^{15,33,34,39}.

Conclusão

Sensibilização a alérgenos de insetos tem sido descrita mundialmente, porém subestima-se a sua importância como causa de doenças alérgicas respiratórias. Dada a alta prevalência de asma e rinite alérgica e o seu impacto na saúde da população mundial, deve-se incentivar realização de novos estudos sobre os seus desencadeantes.

O perfil de sensibilidade alérgica apresenta variações individuais e ambientais, no entanto deve-se considerar que os insetos estão presentes nas mais variadas localizações, em número expressivo e foi comprovada a sua relação com desenvolvimento de sintomas alérgicos respiratórios. Portanto, torna-se fundamental aprofundar o conhecimento sobre os seus alérgenos para melhorar o diagnóstico, o tratamento e a prevenção de alergia a inalantes.

Referências

1. Allergen Immunotherapy Guidelines. European Academy of Asthma and Clinical Immunology, 2017. Disponível em: www.eaaci.org/documents/AIT_Guidelines-web_version. Acessado em: 09/03/2018.
2. Initiative for Asthma - GINA. Bethesda: Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Treatment and Prevention, 2006. Disponível em: <http://www.ginasthma.org>. Acessado em: 10/03/2018.
3. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Folkers WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008. *Allergy*. 2008;63:9-160.
4. Larenas-Linemann D, Salas-Hernández J, Vázquez-García JC, Ortiz-Aldana I, Fernández-Vega M, Del Rio-Navarro EE, et al. Mexican Asthma Guidelines: GUIMA 2017. *Rev Alerg Mex*. 2017;64:s9-s10.
5. IV Consenso Brasileiro sobre Rinite - atualização em rinite alérgica. *Braz J Otorrinolaringol*. 2017;84(1):3-14.
6. Pomés A. Cockroach and Other Insect Allergens. *Clin Allergy Immunol*. 2008;21:183-200.

7. Khurana T, Bridgewater JL, Rabin RL. Allergenic extracts to diagnose and treat sensitivity to insect venoms and inhaled allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2017;118:532-8.
8. Perlman F. Insect as inhalant allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 1959;29:302-28.
9. Ariano R, Panzani RC. Arthropods and invertebrates allergy (with the exclusion of mites): the concept of panallergy. *Allergy*. 2001;56(s69):1-22.
10. Castro FFM, Palma MS. In: *Alergia a veneno de insetos*. Barueri: Editora Manol; 2008. p. 6.
11. Goetz DW. Seasonal inhalant insect allergy: *Haemoria axyridis* ladybug. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009;9:329-33.
12. Patela S, Meherb SB. A review on emerging frontiers of house dust mite and cockroach allergy research. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2016;44(6):580-93.
13. Arruda LK, Vailes LD, Ferriani VP, Santos AB, Pomés A, Chapman MD. Cockroach allergens and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:419-28.
14. <http://www.allergome.org>. Acessado em 10/03/2018.
15. Wu CH, Lee MF, Yang JS, Tseng CY. IgE-binding epitopes of the American cockroach *Per a 1* allergen. *Mol Immunol*. 2002;39(7):459-64.
16. Pastorino AC, Kuschner FC, Arruda LK, Casagrande RR, de Souza RG, Dias GA, et al. Sensitization to aeroallergens in Brazilian adolescents living at the periphery of large subtropical urban centres. *Allergol Immunopathol*. 2008;36(1):9-16.
17. Araujo LM, Rosario NA, Mari A. Molecular-based diagnosis of respiratory allergic diseases in children from Curitiba, a city in Southern Brazil. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2016;44(1):18-22.
18. Feinberg AR, Feinberg SM, Bensaim-Pinto C. Asthma and rhinitis from insect allergens. *J Allergy*. 1956;27:437-44.
19. Kausar MA, Vijayan VK, Bansal SK, Monon BK, Vermani M, Agarwal MK. Mosquitoes as sources of inhalant allergens: Clinicimmunologic and biochemical studies. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(5):1219-21.
20. Witterman AM, van den Oudenrijn S, van Leeuwen J, Akkermans J, van der Zee JS, Aalberse RC. IgE antibodies reactive with silverfish, cockroach and chironomid are frequently found in mite-positive allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;108:165-9.
21. Mendes E, Lacerz CS. *Alergia a insetos*. In: *Alergia nas regiões tropicais*. São Paulo: Editora. Universidade de São Paulo; 1965. p. 88.
22. Suzuki M, Itoh H, Sugiyama K, Takagi I, Nishimura J, Kato K, et al. Causative allergens of allergic rhinitis in Japan with special reference to silkworm moth allergen. *Allergy*. 1995;50:23-7.
23. Kobayashi S, Nakazawa T, Yoshida S. A study on antigenic substances of asthma in sericulture. Part 3. *Japan J Allergol*. 1972;21:107.
24. Inasawa M, Horikoshi K, Tomioka S. A study of bronchial asthma related to silkworm culturing. *Japan J Allergol*. 1973;22:142.
25. Kobayashi S. Occupational asthma due to inhalation of pharmacological dusts and other chemical agents with some reference to other occupational asthmas in Japan. In: *Allergology*. Amsterdam: Excerpta Medica; 1974. p. 53.
26. Tadani S, Tomioka S, Furukawa M. A study of bronchial asthma due to silkworm. *Japan J Allergol*. 1974;23:100-5.
27. Wang X, Zheng S, Zhang H. A study of occupational asthma and specific IgE in sericulture workers. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 1994;16:323-7.
28. Kino T, Oshima S. Allergy to insects in Japan I. The reaginic sensitivity to moth and butterfly in patients with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1978;61:10-6.
29. Kino T, Oshima S. Allergy to insects in Japan II. The reaginic sensitivity to silkworm in patients with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1979;64:131-8.
30. Wynn SR, Swanson MC, Reed CE, Penny ND, Showers WB, Smith JM. Immunochemical quantitation, size distribution, and cross-reactivity of lepidoptera (moth) aeroallergens in southeastern Minnesota. *J Allergy Clin Immunol*. 1988;82:47-54.
31. Sun B, Baoqing Sun, Peiyang Zheng, Nili Wei, Huimin Huang, Guangqiao Zeng. Co-Sensitization to Silkworm Moth (*Bombyx mori*) and 9 Inhalant Allergens among Allergic Patients in Guangzhou, Southern China. www.plosone.org. 2014;9(5):e84776.
32. Araujo LM, Rosario Filho NA, Riedi CA. Respiratory allergy to moth: the importance of sensitization to *Bombyx mori* in children with asthma and rhinitis. *J Pediatr (Rio J)*. 2014;90:178-81.
33. Barne A, Caze-Subra S, Gironde C, Biemvenu F, Biemvenu J, Rouge P. Entomophagy and the risk of allergy. *Rev Franc Allergologie*. 2014;54:315-21.
34. Canonica GW, Ansotegui U, Pawankar R, Schmid-Grendelmeier, van Hage M, Basne-Cagnani B, et al. WAO-ARIA-GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organ J*. 2013;6:1-17.
35. Pruzansky J, Feinberg AR, Schick G, Feinberg SM. Antigenic relationships in insect extracts. *Proc Soc Exper Biol Med*. 1958;97:312-4.
36. Langlois C. Immunologic studies of caddis fly, V. Cross-reaction with other insects. *J Allergy*. 1963;34:385-94.
37. Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43:132-28.
38. Ferrer M, Sanz ML, Sastre J, Bartra J, del Cuvillo A, Montoro J, et al. Molecular diagnosis in allergology: application of the microarray technique. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19:18-24.
39. Jeong KY, Lee J, Lee IY, Rae HI, Hong CS, Yong TS. Allergenicity of recombinant Bla g 7, German cockroach tropomyosin. *Allergy*. 2003;58:1059-63.

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Correspondência:
Laura Maria Lacenda Araujo
E-mail: laura.araujo80@gmail.com



ELSEVIER

Jornal de
Pediatria

www.jpmed.com.br

SOCIEDADE BRASILEIRA
DE PEDIATRIA

ORIGINAL ARTICLE

Respiratory allergy to moth: the importance of sensitization to *Bombyx mori* in children with asthma and rhinitis^{☆,☆☆}

Laura M.L. Araujo^{a,*}, Nelson A. Rosário Filho^b, Carlos A. Riedi^c

^a Child and Adolescent Health, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

^b Pediatrics, Head of the Allergy and Pediatric Immunology Service, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

^c Pediatrics, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

Received 14 June 2013; accepted 2 August 2013

Available online 20 December 2013

KEYWORDS

Sensitization;
Moth;
Asthma;
Rhinitis

Abstract

Objective: this study aimed to prepare a silkworm moth (*Bombyx mori*) antigenic extract and to perform skin prick tests with this extract in patients with allergic respiratory diseases; to evaluate serum specific immunoglobulin E (IgE) to *Bombyx mori* using ImmunoCAP® system and to report the frequency of positivity between the two methods and with clinical data.

Methods: this was a cross-sectional study with 99 children and adolescents diagnosed with asthma and/or allergic rhinitis, who had skin reactivity to at least one of the six aeroallergens tested. Clinical data were evaluated: skin prick tests with *Bombyx mori* in-house extract, and total and specific IgE analysis using ImmunoCAP® were performed.

Results: the frequency of *Bombyx mori* specific IgE was found to be 52.5% and 60% using the skin prick test and ImmunoCAP®, respectively. An association between a positive skin test for *Bombyx mori* and the presence of allergic rhinitis, atopic dermatitis, and urticaria was observed, but the same was not true for asthma or allergic conjunctivitis. There was no relation with the severity of asthma or rhinitis symptoms.

Conclusions: a high frequency of sensitization to *Bombyx mori* was observed in a selected population of patients with respiratory allergic diseases in the city of Curitiba, state of Paraná, Brazil. The extract prepared from the wings of this moth species is effective in demonstrating this sensitivity.

© 2013 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de CC BY-NC-ND

* Please cite this article as: Araujo LM, Rosário Filho NA, Riedi CA. Respiratory allergy to moth: the importance of sensitization to *Bombyx mori* in children with asthma and rhinitis. J Pediatr (Rio J). 2014;90:176–81.

** Study conducted at Allergy and Pediatric Immunology Service, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná.

* Corresponding author.

E-mail: laura.araujo80@gmail.com (L.M.L. Araujo).

PALAVRAS-CHAVE

Sensibilização;
Mariposa;
Asma;
Rinite

Alergia respiratória à mariposa: importância da sensibilização à *Bombyx mori* em crianças com asma e rinite

Resumo

Objetivo: Preparar extrato antigênico da mariposa do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) e realizar testes cutâneos com esse extrato em pacientes com doenças respiratórias alérgicas, avaliar IgE sérica específica para *Bombyx mori* usando o sistema ImmunoCAP® e relatar a frequência de positividade entre os dois métodos e com dados clínicos.

Métodos: Estudo transversal com 99 crianças e adolescentes com diagnóstico de asma e/ou rinite alérgica, que apresentaram reação cutânea a pelo menos um dos seis aeroalérgenos testados. Os dados clínicos foram avaliados; testes cutâneos com extrato de *Bombyx mori* e análise de IgE total e específica por ImmunoCAP® foram realizados.

Resultados: A frequência de IgE específica para *Bombyx mori* foi de 52,5% e 60%, respectivamente, pelo teste cutâneo e ImmunoCAP®. Foi observada uma associação entre o teste cutâneo positivo para *Bombyx mori* e a presença de rinite alérgica, dermatite atópica e urticária, mas o mesmo não ocorreu para a asma ou conjuntivite alérgica. Não houve relação com a gravidade dos sintomas de asma ou rinite.

Conclusões: Alta frequência de sensibilização à *Bombyx mori* foi encontrada em uma população selecionada de pacientes com doenças alérgicas respiratórias na cidade de Curitiba, estado do Paraná, Brasil. O extrato preparado a partir das asas dessa espécie de mariposa é eficaz em demonstrar essa sensibilidade.

© 2013 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda.
Este é um artigo Open Access sob a licença de CC BY-NC-ND

Introduction

Sensitization to inhalant allergens is a risk factor for the development of allergic diseases such as asthma and rhinitis. Knowledge about sensitizing allergens and their degree of exposure in different environments is essential for the diagnosis and treatment of allergic respiratory diseases. *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Blomia tropicalis* mites are the main sensitizers for patients diagnosed with asthma and allergic rhinitis.^{1,2}

The participation of insects in allergic respiratory reactions has been discussed for decades.³ The most extensively studied insect has been the cockroach, whose domestic infestation is a cause of asthma and is considered to be a public health issue.⁴ There have been descriptions of asthma and rhinitis triggered by species of flies and mosquitoes such as the mayfly and the caddis fly.^{5,6} A study conducted with asthmatic patients in the city of São Paulo, Brazil, evidenced positive skin prick test (SPT) with mosquito extract in 32.5% of cases, and positive SPT with moth extract in 65% of cases.⁷

There have been several reports of individuals who, during the process of silk production, developed respiratory allergic diseases. While caring for silkworm cocoons, workers are exposed directly to their inhalant antigens, present from the selection to the hatching of cocoons, when there is contact with dust from the moths' wings.⁸ These allergens can trigger asthma,⁹ rhinitis, and conjunctivitis symptoms.¹⁰

The silkworm moth has cross-reactivity with other species of moths and butterflies; it has been shown that patients with respiratory allergic diseases can develop symptoms from environmental exposure to their allergens.^{11,12} Concentrations of moth antigens verified by radioimmunoassay in samples of dust in the external environment (not

home) for a period of three years were high and at levels comparable to those of pollen.

Skin tests with moth extract in allergic patients had 45% reactivity in this population.¹³ In 1997, allergy skin tests in atopic children in the city of Curitiba, state of Paraná, Brazil, detected 38.4% of positivity to moth extract (1:20 Heterocera weight/volume), the second most frequent after the *Dermatophagoides pteronyssinus* mite (97.5%). It was suggested that the high rate of sensitization to moth required a better evaluation of its clinical relevance.¹⁴

The aim of this study was to determine the sensitivity to *Bombyx mori* by SPT using silkworm moth wing antigens and specific serum immunoglobulin E (IgE) in children diagnosed with asthma and/or allergic rhinitis.

Methods

This was a cross-sectional study with non-probabilistic sampling of 99 children and adolescents of both genders with a diagnosis of asthma and/or allergic rhinitis treated at the outpatient allergy clinic of Allergy and Pediatric Immunology Service, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, with positive SPT for at least one of the following antigens: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*, *Blattella germanica*, *Lolium multiflorum*, dog epithelium, or cat epithelium.

The diagnosis and classification of respiratory allergic diseases (asthma and rhinitis) followed the recommendations of the Global Initiative for Asthma (GINA)¹⁵ and Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA),¹⁶ respectively.

The allergen extract of *Bombyx mori* was prepared from the wings of this species using the following method: the material from the insect was macerated with a pestle in a ceramic mortar and the content was degreased with ethyl

ether. For antigen extraction, the approximate amount of 2 g of insect particles was placed in 20 mL of cold sterile buffer solution (PBS), mixed for six minutes, and allowed to stand for 48 hours at 8°C. The mixture was then centrifuged for 15 minutes at 12,000 rpm, and the supernatant was filtered using sterile polyethersulfone filters (Millipore Express® PLUS Membrane Filters, USA) containing pores of 0.2 micrometers in diameters.

After bacteriological sterility tests, the filtrate was diluted in 50% glycerin, 1:20 (weight/volume). This final concentration was chosen to allow for comparison with the results of a similar study conducted in 1997, in which allergy skin tests were performed with allergen extract standardized at 1:20 from *Heterocera* sp. moth (Hollister-Stier Laboratories®, USA) in children diagnosed with asthma and allergic rhinitis.¹⁴ This concentration of 1:20 is commonly used by manufacturers of glycerinated allergenic extracts for SPT. The allergen extract was stored in bottles with a dropper and kept refrigerated at 4°C.¹⁷

All subjects underwent the SPT with the extract prepared from *Bombyx mori* according to the following technique: the volar surface of the right forearm was cleaned with 70% ethyl alcohol; then, a drop of the extract was applied on the skin and the location marked with skin marker pen. The positive control was performed with histamine at a concentration of 10 mg/mL (IPI/ASAC, Brazil) and the negative control with 50% saline/glycerol (IPI/ASAC, Brazil) with a 3-cm distance between them. The puncture technique was used with a 27-mm sterile needle applied superficially on the skin surface at an angle of 20°. After 15 minutes, the reading of the reaction was performed with the aid of a millimeter-scale ruler. The test was considered positive when the mean of the two perpendicular diameters of the papule was ≥ 3 mm.¹⁸

Serum samples were separated into aliquots in Eppendorf tubes at -80°C until measurement of total IgE and specific IgE to allergens from *Bombyx mori*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis*, *Blattella germanica*, dog epithelium, and cat epithelium through the ImmunoCAP® method. Each allergen was covalently coupled to a solid phase and reacted with specific IgE antibodies contained in the serum sample of patients.

In the case of *Bombyx mori*, the antigen coupled to the solid phase is derived from the wings of this kind of moth, and the allergen components are not available for this insect. Then, nonspecific antibodies were removed by washing and anti-IgE antibodies were added, bound to the β -galactosidase enzyme. After incubation, the antibodies (anti-IgE-enzyme) that were not bound were removed by a new washing process. The enzyme substrate contained in the development solution was added to the reaction medium. The reaction was then discontinued by adding the stop solution, and the fluorescence was measured, which is proportional to the amount of specific IgE in the sample. The concentration of total IgE was expressed in kU/L and for the specific IgE, kUA/L.¹⁹ Values > 0.7 kUA/L were considered positive.

The research project was approved by the Ethics Committee on Human Research of the HC-UFPR; parents or guardians signed the informed consent and participants older than 12 years old signed the term of agreement.

For statistical analysis, the software program Statistica (Statsoft®, USA) was used. Measures of central tendency and

Table 1 Frequency of positivity to specific IgEs through ImmunoCAP® (> 0.7 kUA/L) and serum levels of specific and total IgEs.

IgE (kUA/L)	n (%)	Median (min-max)
<i>Blomia tropicalis</i>	88 (88.9)	17.7 (0 - >100.0)
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	86 (86.7)	82.4 (0 - >100.0)
<i>Dermatophagoides farinae</i>	85 (85.8)	46.2 (0 - >100.0)
<i>Bombyx mori</i>	60 (60.6)	1.1 (0 - >100.0)
<i>Blattella germanica</i>	47 (47.5)	0.6 (0 - 52.4)
Dog epithelium	22 (22.2)	0.2 (0 - 31.5)
Cat epithelium	16 (16.2)	0.0 (0 - 71.3)
Total IgE (kU/L)	-	883.0 (73.9 - >5,000.0)

dispersion were expressed as median, minimum and maximum values. The nonparametric Mann-Whitney's test was used to estimate the difference of variables with asymmetric distribution. The estimated difference between categorical variables was performed by Fisher's exact test and the chi-squared test. The univariate logistic regression model was used to estimate the probability of SPT positivity according to the levels of specific IgE to *Bombyx mori*. A minimum level of significance of 5% and a minimum test power of 85% were considered for all tests.

Results

The mean age of patients was 10.4 ± 2.2 years with a range of 6-15 years (95% CI: 9.9-10.8) and 61 (61.6%) were males. Eighty-seven patients had asthma (87.9%) and 95 had (95.9%) allergic rhinitis; 12 (12.1%) had only rhinitis, and four (4.0%) had only asthma.

Among patients with asthma, 31 (35.6%) were classified as having the intermittent or persistent mild form, 46 (52.9%) had persistent moderate, and ten (11.5%) had persistent severe asthma. Among patients with allergic rhinitis, 24 (25.3%) had the mild form (intermittent or persistent mild rhinitis) and 71 (74.7%) had persistent moderate/severe.

Eye symptoms (eye pruritus, tearing, conjunctival hyperemia, or congestion) were reported by 66.7% of patients. Among other allergic diseases, atopic dermatitis was diagnosed in nine (9.1%) patients and urticaria in six (6.1%).

A positive reaction at SPT to the *Bombyx mori* extract was observed in 52 patients (52.5%), the second in frequency after dust mites; *Dermatophagoides pteronyssinus*, 82 (82.8%), and *Blomia tropicalis*, 69 (69.7%). The other observed reactions were to cockroach (*Blattella germanica*), dog epithelium, rye grass (*Lolium multiflorum*) pollen, and cat epithelium with 17.2%, 16.2%, 15.1%, and 12.1% of positive SPTs, respectively.

Table 1 shows the frequency of positive ImmunoCAP® tests using a cutoff of 0.7 kUA/L; the levels of specific IgE and total IgE were expressed as medians (minimum and maximum values).

Univariate logistic regression analysis showed a good positive association between SPT and levels of specific IgE to *Bombyx mori* ($p = 0.006$).

Table 2 Association between SPT positivity for *Bombyx mori* and other skin tests (n = 99).

Allergens	SPT BOMBYX + n = 52 (%)	SPT BOMBYX – n = 47 (%)	p
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	43 (82.7)	39 (83.0)	1.00
<i>Blomia tropicalis</i>	36 (69.2)	33 (70.2)	1.00
<i>Blattella germanica</i>	08 (15.4)	09 (19.1)	0.79
<i>Lolium multiflorum</i>	09 (17.3)	06 (12.8)	0.58
Dog epithelium	11 (21.1)	05 (10.6)	0.18
Cat epithelium	08 (15.4)	04 (8.5)	0.36

Fisher's exact test.

Table 3 Serum levels of total and specific IgE according to SPT positivity for *Bombyx mori* (n = 99).

IgE (kU/L)	SPT + (n = 52)	SPT – (n = 47)	p
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	88.8 (0.0 – 146.0)	62.6 (0.0 – 144.0)	0.75
<i>Dermatophagoides farinae</i>	50.3 (0.0 – 127.0)	36.2 (0.0 – 126.0)	0.77
<i>Blomia tropicalis</i>	24.2 (0.0 – 113.0)	11.9 (0.0 – 111.0)	0.07
<i>Blattella germanica</i>	1.0 (0.0 – 52.4)	0.3 (0.0 – 37.3)	0.002
Dog epithelium	0.2 (0.0 – 6.3)	0.2 (0.0 – 31.5)	0.13
Cat epithelium	0.0 (0.0 – 71.3)	0.0 (0.0 – 32.5)	0.14
<i>Bombyx mori</i>	3.1 (0.0 – 100.0)	0.4 (0.0 – 83.0)	< 0.001
Total IgE (kU/L)	1107.0 (73.9 – 5,000.0)	772.0 (93.0 – 5,000.0)	0.13

Mann-Whitney's test

Table 4 Frequency of positivity for specific IgEs (> 0.7 kU/L) according to SPT positivity for *Bombyx mori* (n = 99).

Allergens	SPT + n = 52 (%)	SPT – n = 47 (%)	p
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	45 (52.3)	41 (47.7)	1.00
<i>Dermatophagoides farinae</i>	45 (52.9)	40 (47.1)	1.00
<i>Blomia tropicalis</i>	48 (54.5)	40 (45.4)	0.34
<i>Blattella germanica</i>	30 (63.8)	17 (36.2)	0.04
Dog epithelium	16 (72.7)	06 (27.3)	0.05
Cat epithelium	11 (68.7)	05 (31.2)	0.18
<i>Bombyx mori</i>	39 (65.0)	21 (35.0)	0.003

Fisher's exact test.

There was an association between SPT positivity for *Bombyx mori* and the presence of allergic rhinitis ($p = 0.04$), atopic dermatitis ($p = 0.03$), and urticaria ($p = 0.02$). However, there was no association with the presence of asthma ($p = 0.36$) and eye symptoms ($p = 0.14$). Likewise, there was no difference in the severity of asthma ($p = 0.73$) or allergic rhinitis symptoms ($p = 0.37$).

Regarding the frequency of positivity for *Bombyx mori* in relation to other SPTs, there was no significant association (Table 2).

The analysis of serum levels of total and specific IgE antibodies in relation to the SPT for *Bombyx mori* tended to be higher in patients sensitized to the moth. However, only the serum levels of specific IgE to cockroach and to the moth were significantly elevated in these patients who were positive at the SPT for *Bombyx mori* (Table 3).

There was a significantly higher frequency of positivity of specific IgEs to dog epithelium, *Blattella germanica*, and *Bombyx mori* (Table 4).

Discussion

The prevalence of respiratory allergic diseases has increased worldwide in the last decades.^{20,21} In Brazil, the same trend of increase in asthma and rhinitis symptoms has been observed.²² Knowledge about sensitizing aeroallergens is essential for diagnosis, treatment, and prevention.²

Dust mites are the main allergenic sources in patients with asthma and allergic rhinitis.^{23,24} The importance of insect inhalant antigens has been discussed for decades.^{3,7} In this study, the moth was the second most frequent aeroallergen regarding positivity verified by SPT and specific IgE serum levels, suggesting that this insect should be considered a sensitizing agent for patients with asthma and allergic rhinitis.

The study participants were not silk industry workers, and therefore had no occupational exposure to *Bombyx mori*. Kino and Oshima evaluated asthmatic patients at random and found sensitivity to moth and butterfly by SPT and

radioallergosorbent test (RAST) in the sera of over one third of cases. The authors concluded that the insects are easily attracted to the artificial light of households and may cause sensitization and respiratory allergy symptoms.^[11]

A group of asthmatics with no history of occupational exposure ($n = 50$) showed a frequency of positivity at the SPT for *Bombyx mori* of 68%,¹² higher than that observed in the present patients (52.5%); both studies used antigenic extract prepared from the wings of moths. This difference may have occurred because the population was studied in Japan, in smaller numbers, consisted of adults, and had different life habits and exposure to different climate and environment.

This study showed an association between SPT positivity for *Bombyx mori* and the corresponding specific serum IgE by ImmunoCAP®, which demonstrates the effectiveness of the extract made to test sensitization to moth. Moreover, in patients with positive SPT, levels of specific IgE to *Bombyx mori* were higher.

When evaluating the frequency of positivity to specific IgE for moth according to the severity of allergic rhinitis, it was observed that patients with more severe disease had more positive serum specific IgEs for moth by the RAST method,²⁵ differently from that found for the population of the present study, in which there was more positivity at the SPT for *Bombyx mori* in patients with rhinitis; however, there was no correlation with symptom severity. This difference may be explained by the different methods used to detect specific IgE and by the higher number of participants in the study conducted in Japan.

Although the assessed population of patients with atopic dermatitis and urticaria was small, more dermatological allergic diseases were diagnosed in those reactive to moth. This could be explored in the future, as there have been few reports of allergic and irritant reactions in the skin after contact with moths.^{26,27}

It is known that there is cross-reactivity between insect allergens. It was demonstrated by RAST-inhibition assay that there is cross-reactivity between similar species, such as butterfly and moth,¹² but also between different species, such as moth and mosquito.²⁸

The molecular allergy techniques allowed for the identification of the major allergen of *Bombyx mori* larvae (Bom m 1), which is constituted by arginine kinase protein and displays cross-reactivity with arginine kinase from the cockroach.²⁹ In the study, it was observed that patients reactive to *Bombyx mori* at the SPT showed a higher frequency of positivity and higher levels of serum specific IgEs for *Blattella germanica*, which could be explained by the cross-reactivity between them. However, the same did not occur when comparing the positive skin reactions between moth and cockroach, but the immunochemical analysis of these allergens was not performed.

Moreover, inhibition tests with extracts from moth and mites showed differences between their antibodies, demonstrating that there is no cross-reactivity between them.¹² In the study, there was no association between the frequency of skin reactivity at the SPT to mite and moth antigens (*Dermatophagoides pteronyssinus* and *Blomia tropicalis*). Similarly, there was no association between positivity at the SPT for *Bombyx mori* and the presence of specific serum IgE to mites (*Dermatophagoides pteronyssinus*,

Dermatophagoides farinae, and *Blomia tropicalis*), probably because there is no cross-reactivity between them.

One study from China identified another allergen component of *Bombyx mori* (Bom m 7), also obtained from the larvae of this insect, but consisting of tropomyosin protein.³⁰ It is considered a pan-allergen, able to show broad cross-reactivity with components of other insects such as Der p 10 (from the *Dermatophagoides pteronyssinus* mite) and Bla g 7 (from the *Blattella germanica* cockroach).^{31,32} Therefore, to verify true allergic sensitization or cross-reactivity, future studies should be performed, based on molecular allergy diagnosis, but using allergenic components of the *Bombyx mori* moth and not of its larvae as a cause of respiratory allergic symptoms.^{33,34}

This study was the first on sensitization to the silkworm moth performed in Brazil, and showed the importance of *Bombyx mori* as a sensitizing allergen in children and adolescents diagnosed with allergic respiratory diseases (asthma and/or rhinitis). A high frequency of sensitization to *Bombyx mori* was found in patients evaluated by SPT with an extract prepared from the wings of moths; these results were confirmed by ImmunoCAP®, a well-established method for detection of specific serum IgE.

The identification of this aeroallergen (moth), together with the other groups that compose the profile of allergic sensitization in this population, should make their treatment more efficient, as it will allow for adjustments in environmental control procedures, as well as provide new specific immunotherapy options in the future.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Custovic A, Simpson A. Environmental allergen exposure, sensitisation and asthma: from whole population to individuals at risk. *Thorax*. 2004;59:825-7.
2. Dutra BM, Rosário NA, Zavadniak AF. Alérgenos inaláveis em Curitiba: uma revisão de sua relevância clínica. *Rev Bras Alerg Immunopatol*. 2001;24:189-95.
3. Perlman F. Insects as inhalant allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 1958;29:302-28.
4. Arruda KL, Vailes LD, Ferriani VP, Santos AB, Pommés A, Chapman MD. Cockroach allergens and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:419-28.
5. Feinberg AR, Feinberg SM, Benaïm-Pinto C. Asthma and rhinitis from insect allergens. *J Allergy*. 1956;27:437-44.
6. Kino T, Chihara J, Fukuda K, Sasaki Y, Shogaki Y, Oshima S. Allergy to insects in Japan III High frequency of IgE antibody responses to insects (moth, butterfly, caddis fly, and chironomid) in patients with bronchial asthma immunochemical quantitation of the insect related airborne particles smaller than 10 µm in diameter. *J Allergy Clin Immunol*. 1987;79:857-66.
7. Mendes E, Lacaz CS. Alergia a insetos. In: *Alergia nas regiões tropicais*. São Paulo: Editora Universidade de São Paulo; 1965. p. 89.
8. Kobayashi S, Nakazawa T, Yoshida S. A study on antigenic substances of asthma in sericulture. Part 3 Japan *J Allergol*. 1972;21:107.

9. Inasawa M, Horikoshi K, Tomioka S. A study of bronchial asthma related to silkworm culturing. *Japan J Allergol*. 1973;22:142.
10. Kobayashi S. Occupational asthma due to inhalation of pharmacological dusts and other chemical agents with some reference to other occupational asthmas in Japan. *Allergology*. Amsterdam: Excerpta Medica; 1974. p. 53.
11. Kino T, Oshima S. Allergy to insects in Japan I. The reaginic sensitivity to moth and butterfly in patients with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1978;61:10-6.
12. Kino T, Oshima S. Allergy to insects in Japan II. The reaginic sensitivity to silkworm in patients with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1979;64:131-8.
13. Wynn SR, Swanson MC, Reed CE, Penny ND, Showers WB, Smith JM. Immunochemical quantitation, size distribution, and cross-reactivity of lepidoptera (moth) aeroallergens in southeastern Minnesota. *J Allergy Clin Immunol*. 1988;82:47-54.
14. Rosário NA, Vilela MM. Quantitative skin prick tests and serum IgE antibodies in atopic asthmatics. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 1997;7:40-5.
15. Global Initiative for Asthma - GINA. Bethesda: Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Treatment and Prevention, 2006. [cited 2012 Feb 10]. Available from: http://www.ginasthma.org/pdf/GINA_Report_2010.pdf
16. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008. *Allergy*. 2008;63:8-160.
17. Liert MB, Riordan MM, Fischer TJ. Prevalence of insect allergen-specific IgE in allergic asthmatic children in Cincinnati. *Ohio Ann Allergy*. 1994;72:45-50.
18. Nelson HS. In vivo testing for immunoglobulin E-mediated sensitivity. In: Leung DYM, Sampson HA, Geha R, Szefer SJ, editors. *Pediatric allergy - principles and practice*. 2nd ed. Oxford: Elsevier; 2011. p. 250-8.
19. Método de avaliação de IgE específica e total - ImmunoCAP PHADIA®. [cited 2012 Feb 12]. Available from: <http://www.phadia.com>
20. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee *Lancet*. 1998;351:1225-32.
21. Lai CK, Beasley R, Cran J, Foliaski S, Shah J, Weiland S. International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase Three Study Group Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*. 2009;64:476-83.
22. Solé D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK. ISAAC-Brazilian Group Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)- Phase 3. *J Pediatr (Rio J)*. 2006;82:341-6.
23. Naspitz CK, Solé D, Jacob CA, Sarinho E, Soares FJ, Dantas V, et al. Sensibilização a alérgenos inalantes e alimentares em crianças brasileiras atópicas, pela determinação in vitro de IgE total e específica - Projeto Alergia (PROAL). *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80:203-10.
24. Fernandez-Caldas E, Lockey RF. *Blomia tropicalis*: a mite whose time has come. *Allergy*. 2004;59:1161-4.
25. Suzuki M, Itoh H, Sugiyama K, Takagi I, Nishimura J, Kato K, et al. Causative allergens of allergic rhinitis in Japan with special reference to silkworm moth allergen. *Allergy*. 1995;50:23-7.
26. Dinehart SM, Archer ME, Wolf JE, Mcgraven MH, Reitz C, Smith EB. Caripito itch: dermatitis from contact with *Hylestia* moths. *J American Academy Dermatol*. 1985;13:743-7.
27. Ooi PL, Goh KT, Lee HS, Goh CL. Tussockosis: an outbreak of dermatitis caused by tussock moths in Singapore. *Contact Dermatitis*. 1991;24:197-200.
28. Komase Y, Sakata M, Azuma T, Tanaka A, Nakagawa T. IgE antibodies against midge and moth found in Japanese asthmatic subjects and comparison of allergenicity between these two insects. *Allergy*. 1997;52:75-81.
29. Liu Z, Xia L, Wu Y, Xia Q, Xen J, Roux KH. Identification and characterization of an arginin kinase as a major allergen from silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *Int Arch Allergy Clin Immunol*. 2008;50:8-14.
30. Zhong BX. Protein databank for several tissues derived from five instar of silkworm. *Yi Chuan Xue Bao*. 2001;28:217-24.
31. Aalberse RC. Allergens from mites: implications of cross-reactivity between invertebrate antigens. *Allergy*. 1998;53:47-8.
32. Jeong KY, Lee J, Lee IY, Ree HI, Hong CS, Yong TS. Allergenicity of recombinant Bla g 7. German cockroach tropomyosin. *Allergy*. 2003;58:1059-63.
33. Mari A. When does a protein become an allergen? Searching for a dynamic definition based on most advanced technology tools. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:1089-94.
34. Melioli G, Marcomini L, Agazzi A, Bazurro G, Tosca M, Rossi GA, et al. The IgE repertoire in children and adolescents resolved at component level: a cross-sectional study. *Ped Allergy Immunol*. 2012;40:433-40.